



Estabelecimento in vitro de genótipos de tamarilho e avaliação fisiológica das plantas obtidas



Ana Isabel Miranda Braga

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estabelecimento in vitro de genótipos de tamarilho e avaliação fisiológica das plantas obtidas

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Canhoto (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Sandra Correia (Universidade de Coimbra)

Ana Braga

2015

Aos meus pais, irmão e avós.

“Quero uma casa no campo, com a porta sempre aberta.

*Quero uma casa completa com um pedaço de terra, com o espaço quero o
tempo para adormecer na relva.*

*Longe da selva de cimento eu acrescento que quero cultivar mais do que
mero conhecimento. (...) ”*

Capicua. Casa no campo. Album: Sereia Louca.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Canhoto pela orientação e possibilidade de desenvolver este trabalho assim como pelo esforço nas correções científicas ao mesmo.

À Sandra Correia, pela orientação impecável, pela ajuda nos procedimentos complicados, por me permitir o meu ritmo de trabalho, tendo conseguido manter-me focada no mesmo. Pela amizade e simpatia constantes.

Ao João, (a tocar: Godfather's main title theme, André Rieu) um enorme obrigada, não só pelas inúmeras ajudas nos procedimentos, regas e estatística, mas também pela amizade e companheirismo que tão bem o caracterizam e dão outra vida ao LBVUC. Obrigada pelas palavras certas quando elas mais fizeram sentido.

Aos restantes colegas de laboratório, Lucie, Diana, André, Davide, Ana, Daniela, Rui que tanta companhia prestaram, um obrigada por isso, e que o rádio nunca se cale.

À fortaleza, Andreia, Capela, Fernando, Íris, Sara e Teresa pela amizade, companhia, pelas palavras de incentivo, pelos momentos de pura loucura, bem... por existirem e serem como são. Que os azulejos nunca se apaguem totalmente!

À Dra. M^a José, que as suas metáforas continuem a ser eternas.

Às manas, Cátia, Isabel e Joana pela companhia, força e permanência na parte mais dura do desenvolvimento da tese, a escrita. Que o amor nunca deixe de ser metalógico!

À Beatriz, pela capacidade de esquematizar, por fazer com que os piores livros nunca fossem verdadeiros monstros e acima de tudo por ajudar a que as coisas tenham sido sempre OK. Obrigada, ok?

Aos avós, não fosse o incrível esforço deles, jamais estaria aqui. Obrigada pelos incentivos em “tablete” e pelos conselhos mais sábios e cheios de razão. Acima de tudo, obrigada pelo afeto.

À minha família, mãe, pai e irmão. É impossível qualificar ou enumerar a vossa importância neste trabalho. Obrigada por mo permitirem, pelas palmadinhas nas costas e pela perseverança que sempre me foram inculcando. Acredito que seja um alívio ver que a minha dieta não será só à base de crocodilo, tenho sempre tamarilho também! À Belinha, que as perdas de urina não deixem de ser uma constante na minha receção a casa!

Índice

Abstract.....	2
1. Introdução.....	3
1.1. Contextualização.....	3
1.2. Tamarilho (<i>Solanum betaceum</i> Cav.)	5
1.2.1. Caracterização da espécie.....	5
1.2.2. Cultura <i>in vitro</i> e embriogénese somática	7
1.2.3. Embriogénese somática no tamarilho.....	8
1.3. Melhoramento do tamarilho.....	10
1.4. Stresse hídrico e respostas fisiológicas	11
1.5. Objetivos.....	12
2. Materiais e métodos.....	14
2.1. Material vegetal	14
2.2. Estabelecimento, propagação e avaliação das linhas de tamarilho.....	15
2.2.1. Multiplicação, enraizamento e aclimatização.....	15
2.2.2. Indução de embriogénese somática	16
2.2.3. Proliferação de calo embriogénico, maturação e germinação de embriões somáticos	17
2.2.4. Ensaio de germinação de sementes.....	17
2.3. Avaliação da resposta fisiológica de plantas micropropagadas sobre stresse hídrico.....	18
2.3.1. Manutenção e imposição de stresse hídrico	18
2.3.2. Medição de parâmetros de crescimento e estado hídrico	19
2.3.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos	19
2.3.4. Avaliação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a	20
2.3.5. Quantificação de açúcares solúveis e amido	21

2.3.6.	Quantificação de prolina.....	22
2.3.7.	Quantificação de malondialdeído	22
2.3.8.	Análise estatística	23
3.	Resultados.....	24
3.1.	Multiplicação das linhas de tamarilho <i>in vitro</i> e indução de embriogénese somática.....	24
3.2.	Proliferação de calo embriogénico, maturação e germinação de embriões somáticos	25
3.3.	Germinação <i>in vitro</i> e aclimatização das plântulas.....	27
3.4.	Resposta fisiológica de plantas micropropagadas sobre stresse hídrico	29
3.4.1.	Parâmetros de crescimento e estado hídrico.....	30
3.4.2.	Pigmentos fotossintéticos	31
3.4.3.	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	32
3.4.4.	Quantificação de açúcares solúveis, amido, prolina e MDA.....	35
4.	Discussão	37
4.1.	Multiplicação de tamarilho <i>in vitro</i>	37
4.2.	Proliferação de calo embriogénico, maturação e germinação, e indução de embriogénese somática.....	38
4.3.	Avaliação da resposta fisiológica de plantas micropropagadas sobre stresse hídrico.....	40
5.	Conclusões	45
6.	Bibliografia	47

Resumo

O tamarilho é uma espécie com crescente interesse económico uma vez que produz frutos pouco calóricos e com um forte teor de provitamina A e vitaminas B6, C e E, e contém ainda níveis elevados de proteínas, pectinas, fibras, ferro, cálcio e fósforo. Apesar de apresentar um grande potencial agrícola o seu cultivo apresenta algumas limitações e a sua produção tem sido pouco explorada.

O estabelecimento de rebentos com origem em árvores adultas, com a sua posterior micropropagação e indução de embriogénese somática a partir dos explantes foliares tem sido utilizado como protocolo para a clonagem de árvores adultas desta espécie. Nos ensaios de indução de embriogénese somática realizados no âmbito deste trabalho não se obtiveram embriões somáticos. Para além disso, o desenvolvimento de embriões a partir de calos mantidos *in vitro* apenas se verificou para a linha mais recentemente estabelecida.

A poliploidia pode ter como resultado o efeito “giga” nas plantas, uma condição que se pode revelar importante em termos produtivos. Nos ensaios realizados comparou-se a resposta de plantas tetraploides de tamarilho com plantas diplóides em termos de resposta ao stresse hídrico. Os resultados mostraram que as plantas tetraplóides se comportam melhor em condições de stresse embora nem todos os parâmetros avaliados tenham mostrado a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de plantas. Assim, verificou-se que as plantas tetraplóides apresentam melhores resultados no que diz respeito à eficiência fotossintética e às trocas gasosas. No que diz respeito aos teores de prolina, um aminoácido cuja presença pode indicar stresse na planta, os tetraplóides mostraram uma baixa quantidade da mesma, quando comparados com os diplóides.

Deste modo parece poder concluir-se que as plantas tetraplóides, no estado de desenvolvimento em que foram testadas, apresentam um maior grau de tolerância ao stresse hídrico do que os correspondentes diplóides.

Palavras-chave: Calo; Embriogénese somática; Micropropagação; Stresse hídrico; Tetraplóides;

Abstract

Tamarillo is a species with increasing economic interest. It produces low calorie fruit and has a strong pro-vitamin A content, vitamins B6, C and E, containing high levels of proteins, pectins, fibers, iron, calcium and phosphorus as well. Despite having a great agricultural potential, there are some limitations regarding its cultivation, having its production been poorly explored.

The establishment of shoots originating from adult trees, with its subsequent micropropagation and induction of somatic embryogenesis from leaf explants, has been used as a protocol for the cloning of this species adult trees.

The somatic embryogenesis induction trials conducted in this work didn't have successfully obtained somatic embryos. In addition, the development of embryos from callus maintained in vitro was only observed in the most recently established line.

The polyploidy may result in the "giga" effect, setting place for a plant condition that could prove its importance in productive terms.

For tests comparing the tetraploid and diploid tamarillo plants response to water stress, results have shown that tetraploid plants behave best in terms of stress, although not all parameters presented significant differences between the two groups of plants. Thus, it was found that tetraploid plants exhibit the best results regarding the photosynthetic efficiency for gaseous exchange.

Concerning proline, an amino acid whose presence may indicate stress in the plant, the tetraploid showed a low amount thereof, when compared with diploid. Therefore, it seems reasonable to conclude that the tested tetraploid plants in the state of development show a higher degree of tolerance to water stress than the corresponding diploid.

Keywords: Callus; Micropropagation; Somatic embryogenesis; Tetraploid; Water stress;

1. Introdução

1.1. Contextualização

Face ao crescimento da população, cuja previsão da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) aponta para os 10 000 milhões de pessoas em 2050, e considerando o número de pessoas que têm uma alimentação insuficiente atualmente, valor esse que representa cerca de 800 milhões (FAO, 2009), e todas as implicações que este crescimento poderá trazer, é considerada gritante a necessidade de desenvolver técnicas de agricultura suficientemente produtivas e igualmente sustentáveis.

Com este crescimento previsto, o aumento da esperança média de vida do ser humano e consequente diminuição da área disponível para cultivo, considerando também as mudanças climáticas e tendo em conta as taxas de consumo que têm vindo a aumentar, particularmente no estilo de vida ocidental, a sustentabilidade da agricultura praticada atualmente é posta em causa, sendo necessário produzir mais em áreas menores. Não só a área de cultivo e produtividade são fatores críticos. A aposta em tecnologia que permita a criação de variedades mais resistentes a fatores ambientais assim como em técnicas de manipulação genética que para além de maior produção venham ajudar a colmatar os impactos que a própria prática da agricultura tem no planeta Terra são de elevadíssima importância (Canhoto, 2010).

Sendo a biotecnologia, por definição, um conjunto de metodologias que permitem combinar a ciência básica e a tecnologia e desta junção obter o desenvolvimento de produtos novos, sempre tendo com base as potencialidades dos organismos ou apenas das suas células ou organitos para fins práticos e industriais (Chawla, 2010) esta, aplicada à botânica, refere-se à manipulação de plantas para a obtenção de novas características ou à sua utilização para a obtenção de determinados produtos ou realização de determinadas funções (Canhoto, 2010).

No laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Coimbra (LBVUC) estão em curso várias linhas de investigação com o objectivo de melhorar as características de algumas espécies, em particular de lenhosas. Esses trabalhos têm incidido em espécies como o medronheiro (*Arbutus unedo*), o sobreiro (*Quercus suber*) e o tamarilho (*Cyphomandra betacea*) entre outras. O alto conteúdo dos frutos deste último em provitamina A (150 mg por 100g), vitamina B6, vitamina C (25 mg por 100 g), vitamina E, ferro, cálcio e fósforo torna-o uma espécie de elevado interesse em alguns países que apresentam condições climáticas para a sua cultura, como é o caso de Portugal. Nos últimos anos, vários trabalhos relacionados com a biotecnologia do tamarilho têm sido realizados no LBVUC, com particular incidência na clonagem *in vitro* por embriogénese somática, organogénese e proliferação de meristemas, no desenvolvimento de protocolos de modificação genética e na obtenção de linhas tetraplóides. Algumas das linhas clonadas *in vitro*, incluindo tetraplóides encontram-se em campos experimentais com o objetivo de analisar o seu comportamento. (Fig. 1).



Figura 1- Campo experimental com cerca de 100 plantas de tamarilho localizado em Vale de Cambra e instalado em meados de 2014.

1.2. Tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

1.2.1. Caracterização da espécie

O tamarilho, *Solanum betaceum* Cav. (= *Cyphomandra betacea*), é uma solanácea vulgarmente designada por “tamarillo”, “tree tomato”, “tomate-inglês e “tomate de la paz” (Bois, 1972). Foi em 1967, na Nova Zelândia, que surgiu o nome “tamarillo” para denominar esta espécie, como uma necessidade de lhe dar um nome comercialmente mais apelativo e que, simultaneamente, permitisse uma clara distinção do tomate vulgar, *Solanum lycopersicum*, pertencente à mesma família (Morton, 1987).

Solanum betaceum é uma árvore subtropical de pequeno porte (Fig. 2c), podendo atingir os 5 m de altura, de folhas largas (Fig. 2a), alternadas, em forma de coração na base, ovadas e pontiagudas no ápice com um cheiro almiscarado característico muito intenso (California Rare Fruit Growers, 2015). As flores são rosa esbranquiçadas (Fig. 2b) e, no nosso país, surgem no final da Primavera, a partir dos meristemas axilares de ramos do próprio ano (Correia *et al.*, 2011).

O fruto, normalmente oval, de 4 a 10 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largura, possui um epicarpo de coloração vermelho-púrpura ou amarelo alaranjado, um mesocarpo também amarelado e as suas sementes podem ser púrpura ou amarelas dependendo da variedade (Figs. 3a e b). Este fruto é consumido cozinhado ou cru, incorporado em sobremesas e saladas ou usado em produtos processados, como sumos ou compotas. Em Portugal, o tamarilho é cultivado principalmente nas ilhas atlânticas, mas tem despertado o interesse de alguns agricultores do continente (Guimarães *et al.*, 1996; Correia e Canhoto, 2012).

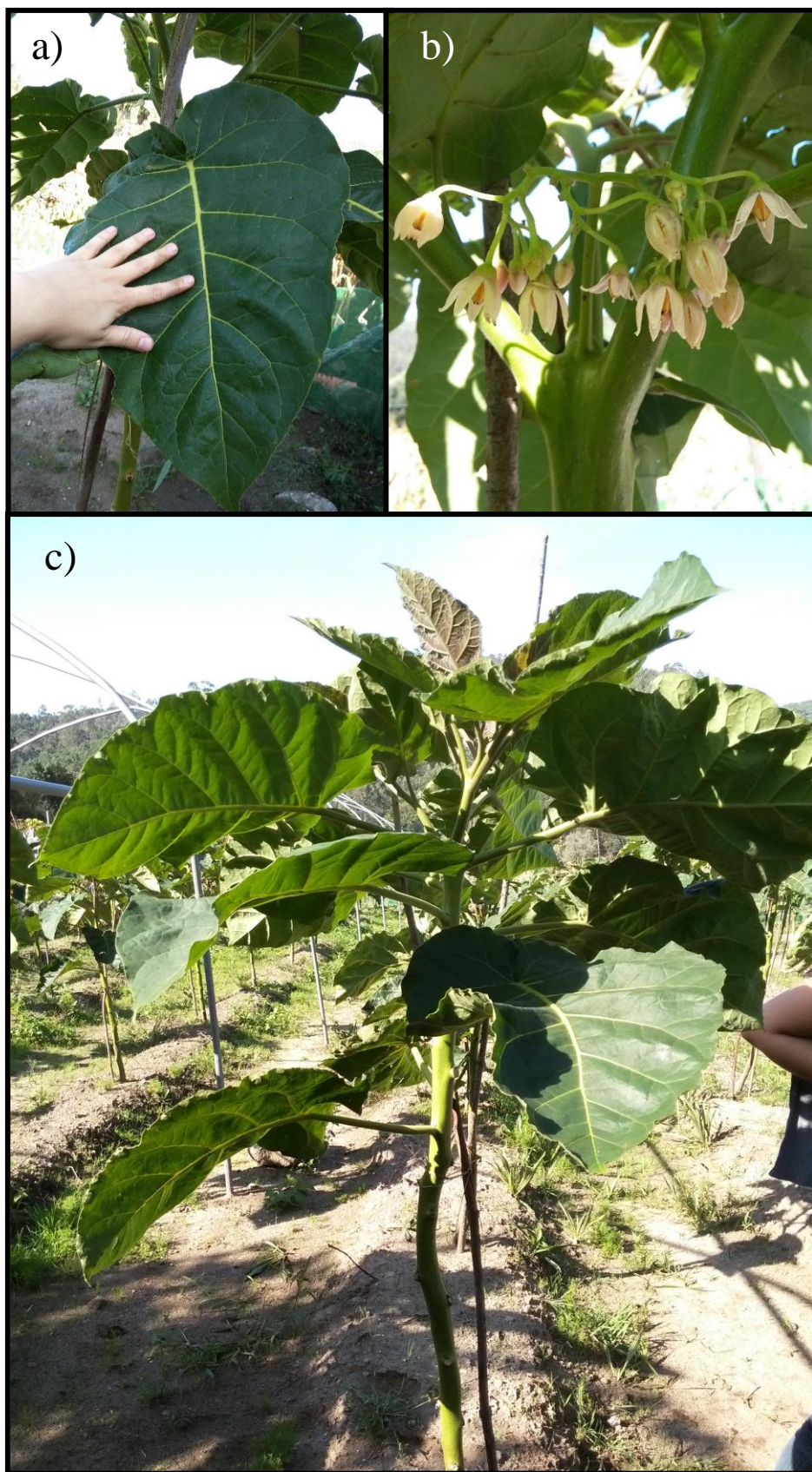


Figura 2- Aspectos morfológicos do tamarilho. a) Folha, b) flores, c) árvore jovem localizada em Vale de Cambra.

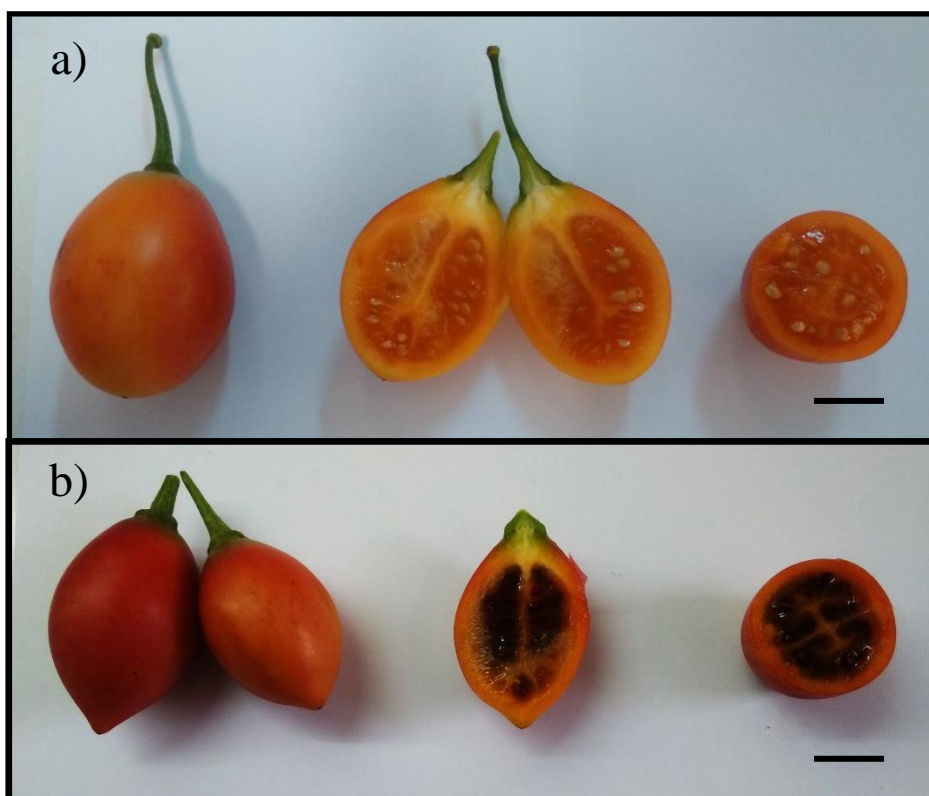


Figura 3 – Frutos de tamarilho. a) Tamarilho amarelo. b) Tamarilho vermelho. Da esquerda para direita: aspeto externo do fruto, fruto sectionado longitudinalmente e seccionado transversalmente. Barra = 2 cm.

1.2.2. Cultura *in vitro* e embriogénese somática

A propagação de cultivares de tamarilho pode ser feita por sementes e estacaria (Prohens e Nuez, 2001). No entanto, a propagação por sementes não permite obter uniformidade genética, nem a propagação de genótipos selecionados, apesar do facto do tamarilho apresentar autofecundação e, por isso, as plantas obtidas por semente de uma mesma árvore, poderem apresentar uma forte similaridade. Assim a clonagem, *in vitro* surge como uma ferramenta muito útil para a propagação e melhoramento do tamarilho (Barghchi, 1998; Correia e Canhoto, 2012).

Trabalhos anteriores mostraram ser possível a propagação *in vitro* de tamarilho utilizando diferentes protocolos de indução de embriogénese somática, organogénese e

proliferação de meristemas axilares (Correia e Canhoto, 2012). O primeiro método a ser utilizado foi a micropropagação de tamarilho através da proliferação de meristemas axilares (Cohen e Elliot, 1979; Barghchi, 1986). Mais tarde obteve-se a regeneração da planta por organogénese em explantes foliares (Obando *et al.*, 1992) e por cultura de protoplastos (Tomé *et al.*, 1992). Mais recentemente, também se conseguiu a micropropagação de plantas de tamarilho através da formação de meristemas caulinares adventícios na página abaxial de explantes foliares e seu ulterior desenvolvimento em rebentos caulinares (Obando e Jordan, 2001; Gatita e Almeida, 2003; Santos, 2012). A embriogénese somática (ES) através da cultura de hipocótilos e embriões zigóticos maduros foi inicialmente descrita por Guimarães e colaboradores (1988) assim como a obtenção de protoplastos (Guimarães *et al.*, 1996).

1.2.3. Embriogénese somática no tamarilho

Por norma o embrião resulta do processo de reprodução sexuada no qual dois gametas se fundem formando o zigoto que se desenvolve em embrião zigótico. Experimentalmente também se podem produzir embriões com origem em células somáticas do tamarilho (Guimarães *et al.*, 1988). Estes embriões somáticos assemelham-se morfológicamente aos zigóticos, sendo estruturas bipolares com polo radicular e polo caulinar (Canhoto, 2010). Uma das limitações da embriogénese somática (ES) frequentemente abordada na literatura é a recalcitrância do material adulto, particularmente de espécies lenhosas (Thrope e Stasolla, 2001), limitando assim a clonagem de árvores selecionadas. No caso do tamarilho, a indução é facilmente conseguida a partir de embriões zigóticos ou mesmo de cotilédones ou hipocótilos isolados (Guimarães *et al.*, 1988). No entanto, estes explantes, embora muito interessantes em termos do rendimento da embriogénese, não permitem a clonagem de árvores selecionadas. Para ultrapassar esta limitação foi desenvolvido um protocolo que permite multiplicar árvores de tamarilho interessantes. Esse protocolo (Correia *et al.*, 2011) passa pelo estabelecimento inicial de segmentos nodais das árvores selecionadas seguido da indução de embriogénese em folhas dos rebentos mantidos em cultura.

A formação de embriões somáticos em tamarilho pode seguir duas vias distintas. A indução de embriogénese somática é obtida num meio de cultura rico em auxinas, no

qual a inclusão de níveis elevados de sacarose aumenta significativamente a eficácia da indução de embriogênese somática (Guimarães et al., 1996). Na presença de NAA, os embriões zigóticos diferenciam-se em embriões somáticos após a formação de um calo reduzido. Por outro lado, com a utilização de 2,4-D ou picloram, os embriões zigóticos ou os segmentos foliares jovens produzem um tecido embriogênico que pode ser mantido por subculturas sucessivas no mesmo meio contendo auxinas (Lopes et al., 2000). Depois de transferidas para um meio sem auxinas, as massas pró-embriogênicas desenvolvem-se em embriões e, posteriormente, em plântulas.

O desenvolvimento de embriões somáticos no tamarilho é um processo assíncrono durante o qual a maioria dos embriões somáticos passa por diferentes fases morfológicas, semelhantes às que ocorrem durante a embriogênese zigótica (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). A subcultura de embriões somáticos no mesmo meio isento de auxinas durante um período adicional de 4-5 semanas dá origem a plântulas normais. Foram frequentemente observadas anomalias morfológicas, tais como cotilédones fundidos, alterações no número de cotilédones e germinação precoce, especialmente com a utilização de baixos níveis de sacarose. Mais recentemente foram realizados ensaios que permitiram aumentar a taxa de conversão de embriões somáticos e o número de plantas obtidas (Correia et al., 2012). Os dados obtidos demonstraram que a manipulação das condições de iluminação e a inclusão de ácido abscísico (ABA) no meio antes da germinação aumenta o número de embriões somáticos morfolologicamente normais produzidos. As análises histoquímicas e bioquímicas revelaram que as células cotiledonares dos embriões somáticos apresentam níveis reduzidos de compostos de reserva, nomeadamente lípidos, quando comparadas com as dos embriões zigóticos. Em alguns casos, a conversão dos embriões ocorreu através do desenvolvimento do rebento sem o desenvolvimento concomitante da raiz. No entanto, é frequente o aparecimento de raízes adventícias na base destes rebentos, tornando possível a obtenção de plantas (Canhoto et al., 2005; Correia et al., 2012).

Após a formação de raízes, as plântulas passam por uma etapa de aclimatização na estufa. Trabalhos anteriores registaram o desenvolvimento de plântulas com anomalias morfológicas nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal que, no decorrer do crescimento, recuperaram o fenótipo normal (Canhoto et al., 2005).

A indução de ES representa portanto um processo morfogénico com aplicações importantes e de elevado interesse, não só para a clonagem de plantas e transformação

genética mas também como modelo para compreender a formação e desenvolvimento do embrião (Correia et al., 2011).

1.3. Melhoramento do tamarilho

A agricultura atravessa um período de mudança e inovação no que toca ao potencial de melhoramento genético das árvores de fruto que a engenharia genética proporciona e que se revela interessante para os produtores destas árvores. As variedades mais comercializadas são obtidas por propagação vegetativa e os híbridos têm sido selecionados pelos produtores e não podem ser melhorados com recurso aos métodos tradicionais devido à sua elevada heterozigotia. Mesmo que os métodos tradicionais de melhoramento sejam eficientes para determinados cultivares, existe sempre como obstáculo o longo período de tempo entre as diferentes gerações. A engenharia genética poderá permitir a inserção de genes específicos no genoma dos diferentes cultivares, acrescentando traços desejáveis e não afetando características já existentes (Cervera et al., 1998; Correia e Canhoto, 2012).

Considerando a importância e interesse pelo tamarilho previamente apontadas, e as limitações no seu cultivo, a seleção de variedades de interesse com características comercialmente mais vantajosas assume alguma relevância (Mertz et al., 2009). O objetivo passa, portanto, pela obtenção de plantas que produzam uma maior quantidade de frutos e que estes sejam de melhor qualidade, mais saborosos, maiores e com maior quantidade de substâncias que possam interessar às indústrias farmacêutica e médica e que possuam melhorias na capacidade de resistência a fatores externos de stresse como é o caso da falta de água e outros fatores abióticos como é o caso da geada, vento forte e temperaturas extremas (Mertz et al., 2009). No caso do tamarilho seria de interesse o aumento do período de produção visto este possuir um ciclo de reprodução curto e com um tempo médio de vida de 8 - 10 anos e isto representar uma limitação para a produção de frutos que se inicia 2 anos após o cultivo, sendo o clímax de produção atingido em 5 anos. Após 6 - 8 anos começa a registar-se um declínio na produção embora esta situação dependa das condições ambientais e do genótipo da própria planta (Meadows, 2002).

O melhoramento pode também passar pela cultura *in vitro* que permite obter plantas com uma melhor qualidade fitossanitária, a criação de variabilidade genética e o armazenamento de germoplasma. Em alternativa destaca-se a propagação de meristemas, hibridização de variantes, (Brown e Thorpe, 1995) indução de embriogénese somática (Correia e Canhoto, 2011), transformação genética (Vidal *et al.*, 2010; Varghese e Bhat, 2011), e criopreservação (Montoya *et al.*, 2000) e a indução de haploidia ou poliploidia (Pintos *et al.*, 2007).

A poliploidia nas plantas é apontada como uma forma de obtenção de linhas com características novas e de elevado interesse para a agronomia, tais como a obtenção de frutos sem sementes e de tamanhos superiores, de flores maiores e de plantas com maior resistência a pestes e stresse hídrico (Zhang *et al.*, 2010). São várias as espécies usadas na agricultura atual em que a poliploidia é uma condição importante do ponto de vista da produção, como é o caso da *Vitis vinifera* (Yang *et al.*, 2006) e *Citrus sinensis* (Zhang *et al.*, 2007). Estudos prévios realizados no LBVUC permitiram obter plantas de tamarilho tetraplóides através da cultura *in vitro* de segmentos nodais na presença de agentes c-mitóticos (Antunes, 2010).

1.4. Stresse hídrico e respostas fisiológicas

A distribuição das plantas é maioritariamente dependente da temperatura do ar e da água disponíveis ao longo das diferentes zonas do planeta (Kozloski e Pallardy, 1997). Com o aumento do CO₂ na atmosfera e consequente aumento da temperatura é esperado também o aumento de consumo de água atmosférica e da frequência de secas e da sua duração (Dore, 2005). Considerando que o stresse hídrico é dos fatores ambientais com maior importância na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, e que os períodos a que as plantas estarão expostas ao mesmo tende a aumentar, é de esperar que haja alterações na produção e nas características bioquímicas das mesmas (Charles, 1993; Brito *et al.*, 2003; Dias e Bürgemann, 2010). A sobrevivência das plantas depende da habilidade das mesmas na perceção do estímulo de falta de água proveniente das raízes e da leitura desse sinal de modo a iniciar as alterações fisiológicas de que a planta necessita para se manter em condições desejáveis

(Shinozaki, 1997; Chaves *et al.*, 2003). O facto de estes fatores influenciarem tão diretamente os processos de desenvolvimento das plantas justifica a procura de formas de tornar as plantas o mais resistentes possível aos períodos de stresse hídrico.

A fotossíntese e a transpiração são dois processos metabólicos associados ao stresse hídrico e à forma como as plantas lidam com ele de modo a criar uma resposta que lhes permita a sua sobrevivência até que a disponibilidade de água volte a aumentar (Zhang e Davies, 1989; Chaves *et al.*, 2003).

O stresse hídrico causa diversas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas que variam consoante a intensidade desse stresse. Isto leva a uma primeira fase de aclimação e à medida que o stresse se intensifica, a danos funcionais e perda de elementos da planta (Chaves *et al.*, 2003; Bedon, 2011). Durante a aclimação dão-se ajustes osmóticos e o aumento da elasticidade das paredes celulares, permitindo à célula manter a sua turgência, que de outra forma não existiria devido à falta de água. A inibição de crescimento das folhas e o fecho dos estomas limitam as trocas gasosas resultando numa reduzida transpiração e fotossíntese que consequentemente reduzem a assimilação de carbono e produtividade (Bedon, 2011).

Vários são os estudos que têm sido feitos sobre o stresse hídrico e as alterações fisiológicas e bioquímicas que este pode induzir nas plantas, registando e comparando parâmetros relativos ao estado hídrico, como o teor relativo em água (TRA) e o potencial hídrico, a peroxidação dos lípidos através da quantificação de malondialdeído (MDA), o conteúdo em clorofila e fluorescência e as trocas gasosas (Dias, 2013; Correia, 2014; Dias, 2014).

No caso do tamarilho não existe informação sobre a maneira como as plantas se comportam em termos de stresse hídrico. O mesmo é verdade relativamente ao comportamento das plantas depois da passagem da fase *in vitro*, para *ex vitro*.

1.5. Objetivos

Os resultados até agora obtidos com o tamarilho demonstraram o interesse desta espécie e que a clonagem a partir de explantes juvenis é fácil de obter mediante diferentes técnicas de cultura *in vitro* como a proliferação de rebentos axilares, organogénese e embriogénese somática. Vários estudos demonstraram ainda que

determinadas cultivares do tamarilho são especialmente interessantes devido ao seu teor elevado em alguns compostos químicos, tais como compostos fenólicos e carotenóides. Como tal, é importante estabelecer-se um conjunto alargado de genótipos e reunir informações relevantes dos mesmos, que sirvam como base a um programa de melhoramento da espécie.

Os objetivos deste trabalho passaram por traçar um perfil da multiplicação por proliferação de meristemas axilares e indução de embriogénese somática, enraizamento e aclimação de tamarilho e das suas características morfológicas, comparando diferentes linhas de tamarilho.

Este trabalho teve também como objetivo a avaliação da performance de plantas de tamarilho diplóides e tetraplóides em condições de stresse hídrico, com o registo de diferentes parâmetros fisiológicos.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal

Na realização deste trabalho foi utilizado material vegetal proveniente de várias árvores do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC) e de árvores de jardins de particulares com características de interesse (Tabela 1). Foram usadas linhas de tamarilho vermelho (Tv) e tamarilho amarelo (Ta), de origens seminal (S) e uma linha estabelecida a partir de material adulto (A). Em Novembro/Dezembro de 2014 foram recolhidos frutos maduros de árvores com diferentes localizações e características, tendo-se procedido ao isolamento de sementes e à sua secagem. Os frutos recolhidos provêm de jardins de particulares (TvS1, TvS2 e TvS3), de árvores de tamarilho instaladas no JBUC (TvJB e TaJB) e uma das linhas (TvS4) provem de frutos com origem na Colômbia. Foram também utilizadas sementes de um fruto com origem num ensaio prévio de hibridação (THJB) entre um tamarilho vermelho (TvJB – “planta masculina”) e um tamarilho amarelo (TaJB – “planta feminina”).

Tabela 1- Origem e localização das árvores utilizadas nos ensaios.

Linhas	Origem	Local
TvT	Tetraploidia (TvM2)	<i>In vitro</i>
TvM1	Seminal	Árvore do JBUC
TvM2	Seminal	Árvore do JBUC
TvA	Clone de árvore adulta	Árvore do JBUC
TvS1	Seminal	Coimbra
TvS2	Seminal	Coimbra
TvS3	Seminal	Leiria
TvS4	Seminal	Colômbia
TvJB	Seminal	Árvore de JBUC
TaJB	Seminal	Árvore de JBUC
THJB	Seminal	Árvore de JBUC

2.2. Estabelecimento, propagação e avaliação das linhas de tamarilho

2.2.1. Multiplicação, enraizamento e aclimatização

As plântulas das linhas clonais TvT, TvM1, TvM2 e TvA, previamente estabelecidas *in vitro*, foram mantidas e multiplicadas (Fig. 4a) em condições de assepsia em caixas de cultura (Microbox Combiness, 97 x 80 mm, com filtro XXL) (Fig. 4b) com meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,2 mg/l de benziladenina (BA) e 3% de sacarose. O pH dos meios de cultura foi ajustado para valores de 5,6 - 5,8 e, após adição de agar (6%) autoclavados a 121 °C e 1 bar durante 20 min. As culturas foram mantidas a 24±1 °C sob um fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuro, durante 4-6 semanas. Para calcular a taxa de multiplicação utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de rebentos final} - n^{\circ} \text{ de rebentos inicial}}{n^{\circ} \text{ de rebentos final}} \times 100$$

O enraizamento foi testado em rebentos caulinares com 1,5-2 cm de altura, cultivados em caixas Microbox Combiness (97 x 120 mm, com filtro XXL) contendo os componentes do meio MS, 3% de sacarose e sem reguladores de crescimento. Durante esta fase as culturas foram mantidas nas mesmas condições de luz e temperatura anteriormente referidas, durante 4-6 semanas, até apresentarem 5 - 6 cm de altura e um sistema radicular desenvolvido. As plantas enraizadas foram transferidas para vasos (200 ml ou 1l) contendo um substrato constituído por uma mistura de terra:perlite (3:1, v/v) com 1,5 g/l de adubo universal Vitaterra® (10% N, 10% P₂O₅, 20% K₂O, 2% MgO, 0,1% Mn e 0,05% Zn), e aclimatizadas em câmara climática com uma intensidade luminosa de 15-20 µmol m⁻² s⁻¹ (luz branca fluorescente) e um fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, 70% de humidade relativa (HR) e 24 °C, durante 4 semanas.

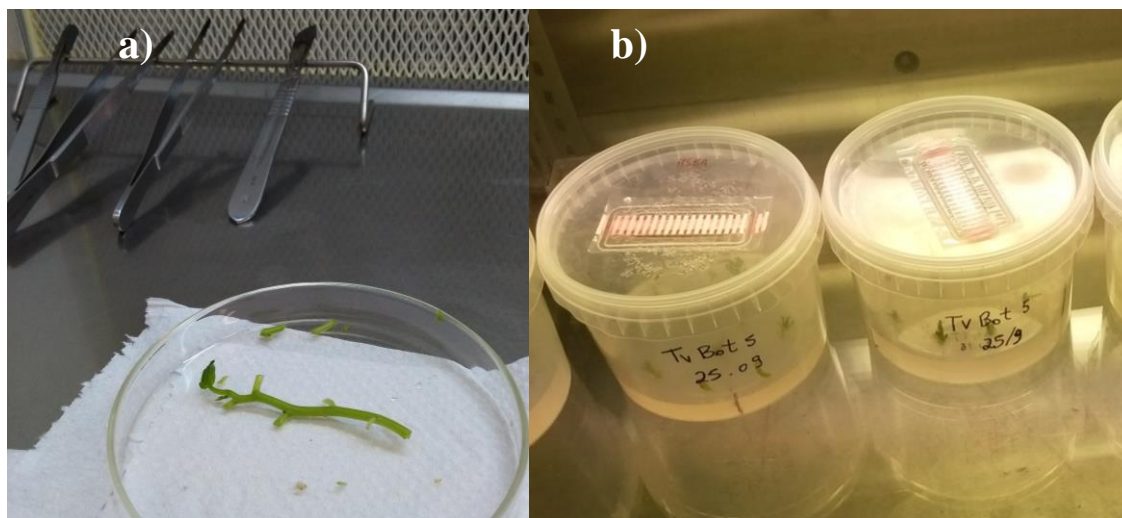


Figura 4 – Multiplicação de rebentos axilares de tamarilho. a) Rebento de tamarilho após remoção das folhas; b) Explantes inoculados em caixas com meio de cultura MS com 0,2 mg/l de BA.

2.2.2. Indução de embriogênese somática

Para a indução de embriogênese somática (ES) foram usadas folhas jovens de rebentos das linhas TvM1 e THJB de acordo com o procedimento descrito por Lopes *et al.* (2000). Foram colocadas em cultura secções foliares com cerca de 0,5 x 0,5 cm nas quais a página abaxial foi aleatoriamente ferida com a ponta de um bisturi. A indução foi realizada em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) contendo 13 ml de meio de indução TP constituído pelo meio base MS suplementado com 9% (w/v) de sacarose e 5 mg/l de picloram. O pH dos meios foi ajustado para 5,7 – 5,8 e gelificado com 2,5 g/l de Phytigel. As culturas foram mantidas em estufa durante 3 meses, a 25 ± 1 °C, no escuro.

2.2.3. Proliferação de calo embriogénico, maturação e germinação de embriões somáticos

Simultaneamente ao ensaio de indução de ES, calo embriogénico com origem nas linhas TvA (CE_TvA) e TvM1 (CE_TvM1-2009 e CE_TvM2-2014) foi mantido em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com cerca de 13 ml de meio TP, numa câmara a 25 ± 1 °C e no escuro em subculturas mensais. Massas de calo embriogénico em proliferação (total de 102 explantes) foram transferidas para meio de maturação – meio TM (meio base MS com 4% (w/v) de sacarose, sem reguladores do crescimento) e incubadas nas mesmas condições de 25 ± 1 °C, no escuro, durante 4 semanas. Os explantes que apresentavam formação de embriões foram selecionados e os embriões transferidos para novos tubos (15 x 2,2 cm) com meio de germinação – meio TG (meio base MS com 2,5% (w/v) de sacarose e colocados em estufa sob um fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro a 24 ± 1 °C.

2.2.4. Ensaios de germinação de sementes

2.2.4.1. Desinfecção, germinação *in vitro* e aclimatização

No ensaio de germinação utilizaram-se sementes previamente isoladas dos frutos das árvores TvS1, TvS2, TvS3, TvS4, TvJB e TaJB. Na desinfecção superficial das sementes estas submeteram-se a uma lavagem com água e 2/3 gotas de tween 20 durante 5 min. seguindo-se uma passagem em álcool a 70% (v/v) de 30 a 60 seg. As sementes foram depois desinfetadas numa solução de hipoclorito de cálcio a 5% (w/v), com agitação, durante 10 min., seguindo-se 3 lavagens com água esterilizada. Depois da desinfecção as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de (15 x 2,2 cm) com 13 ml de 1/2MS e colocadas a 25 ± 1 °C em câmara de cultura com um fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro. Para cada linha foram colocadas em germinação pelo menos 30 sementes.

As plântulas obtidas nos ensaios de germinação foram transferidas para caixas Microbox Combiness (97 x 120 mm, com filtro XXL), com cerca de 80ml de MS mantendo-se nas condições referidas até apresentarem um sistema radicular e um porte que permitia a sua passagem para substrato (cerca de 7 cm de comprimento e folhas desenvolvidas) e condições de aclimatização previamente descritas, em vasos com 200 cm³.

2.2.4.2. Avaliação de parâmetros morfológicos e biomassa das plantas aclimatizadas

Após 6 semanas de aclimatização, pelo menos 10 plantas de cada linha foram transferidas para estufa e avaliadas quanto aos seus parâmetros morfológicos - altura e diâmetro na base do caule, comprimento e largura foliar (na zona mais larga de 3 folhas por planta) e número de folhas. Foi quantificada a biomassa de 3 exemplares por linha. Para registo da biomassa as partes aérea e radicular foram separadas, e secas a uma temperatura de 80 °C durante 3 dias, altura em que o peso seco foi determinado.

2.3. Avaliação da resposta fisiológica de plantas micropropagadas sobre stresse hídrico

2.3.1. Manutenção e imposição de stresse hídrico

Neste ensaio foram usadas duas linhas, uma diploide (TvM2) e uma tetraplóide (TvT) tendo sido esta última induzida com colchicina a partir da linha TvM2 (Antunes, 2010). Depois de aclimatizadas, em vasos de 1l (ver secção 2.1), foram definidos quatro grupos com 5-6 plantas por grupo, dos quais dois funcionaram como controlo sendo continuamente regados até 70% da capacidade de campo do substrato - diplóides com rega (DR) e tetraplóides com rega (TR), durante todo o período de aclimatização, e outros dois foram expostos a stresse hídrico - diplóides em stresse (DS) e tetraplóides

em stresse (TS), tendo sido mantidos sem rega durante 4 dias antes da realização das análises.

2.3.2. Medição de parâmetros de crescimento e estado hídrico

Para avaliação morfológica das plantas em ensaio foram registados o comprimento da parte aérea e da raiz, bem como a razão entre os dois parâmetros (Aérea/Raiz). Foi também registada a massa em peso fresco de todas as plantas. Para registo da biomassa em peso seco as partes aérea e radicular foram separadas, colocadas em sacos de papel e secas a uma temperatura de 80 °C durante 3 dias, tendo sido pesadas posteriormente.

Para determinação do teor relativo de água (TRA), porções de folhas de cada planta de cada um dos grupos foram pesadas em fresco, no estado de turgência, e pesadas novamente depois de completamente secas após 3 dias a 80 °C numa estufa. O potencial hídrico (ψ) das plantas foi medido com uma câmara de Scholander (PMS Instrument Co.).

2.3.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b, carotenóides) foi realizada de acordo com o método descrito por Sims e Gamon (2002). Assim, 50 mg (peso fresco) de folhas de cada planta em ensaio foram congelados e macerados em azoto líquido. Os macerados foram homogeneizados em tubos de centrífuga de vidro com fundo cónico e 10 ml de capacidade (Normax), contendo 2 ml da solução tampão de acetona: tris 50 mM (80:20) a pH 7.8. Após 30 segundos de vórtex procedeu-se à centrifugação das amostras durante 10 min, a 4 °C e 4800 g. O sobrenadante foi recolhido e transferido para tubos *falcon* e mantidos em gelono escuro. Ao *pellet* foram adicionados 3 ml da solução tampão procedendo-se de seguida a nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi recolhido e adicionado ao primeiro. O *pellet* foi descartado e o volume do sobrenadante foi ajustado até perfazer os 6ml utilizando a solução tampão. No final foi medida a absorvência do

sobrenadante, em espectrofotômetro Jenway 7305, para os comprimentos de onda de 663 nm (A_{663}), 537 nm (A_{537}), 647 nm (A_{647}) e 470 nm (A_{470}), sendo que para *blank* foi usada a solução tampão.

2.3.4. Avaliação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

A taxa de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e o conteúdo de CO_2 intercelular (C_i , ppm) foram medidas em 6 réplicas por tratamento (rega e stresse) usando um analisador de gases por infravermelho portátil (LCpro-SD, ADC BioScientific Ltd., UK) equipado com câmara de folha. Foi também calculado o parâmetro de *intrinsic Water Use Efficiency* (WUE_i) como o rácio entre A e E . Para averiguar a intensidade da luz de saturação, curvas A/PPFD (*photosynthetic photon flux density*; curvas de luz de resposta da assimilação de CO_2) foram efetuadas com os seguintes PPFDs: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Depois de analisar a relação A/PPFD , medições pontuais à intensidade da luz de saturação foram efetuadas a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As seguintes condições foram mantidas constantes dentro da câmara: fluxo de ar (200 mol s^{-1}), temperatura (25 °C), CO_2 atmosférico e a concentração em H_2O .

Para determinação da fluorescência da clorofila a em “estado estacionário” utilizou-se um fluorómetro portátil (Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany) conforme descrito por Alves *et al.* (2012) utilizando as mesmas folhas do ensaio de trocas gasosas descrito acima. Os componentes adaptados à luz da fluorescência da clorofila foram medidos: fluorescência no estado estacionário (F), fluorescência máxima (F'_m), a fluorescência variável (F'_v ; equivalente a $F'_m - F$) e o rendimento quântico da fotoquímica do fotossistema II [ϕPSII ; equivalente a $(F'_m - F)/F'_m$]. As folhas foram depois mantidas no escuro durante cerca de 20 min para obter a fluorescência mínima (F_0), a fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v ; equivalente a $F_m - F_0$), o rendimento quântico da fotoquímica do PSII (F_v/F_m) e a extinção não-fotoquímica [*Non-photochemical quenching*, NPQ; equivalente a $(F_m/F'_m)^{-1}$].

2.3.5. Quantificação de açúcares solúveis e amido

Para quantificação dos açúcares solúveis uma amostra de 50 mg de folhas de tamarilho congelada em azoto líquido foi macerada e transferida para um tubo de centrífuga ao qual se adicionaram 10 ml de etanol 80% (v/v). Após incubação (1 h) a 80 °C e centrifugou-se a 4800 g, durante 15 min, a 4 °C. Após centrifugação, 100 µl de sobrenadante foram transferidos para um tubo *eppendorf* (2ml) ao qual se juntou 1,5 ml de solução de antrona (0,04 g de antrona, 1 ml de água destilada e 20 ml de ácido sulfúrico concentrado) e esta mistura submetida a uma incubação de 10 min. a 100 °C e posterior arrefecimento em gelo durante cerca de 10 min. Como controlo usou-se uma amostra constituída por 100 µl de etanol 80% (v/v) e 1,5 ml da solução de antrona. A absorvância das amostras foi determinada a 625 nm num espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384. Para determinar a quantidade de açúcares solúveis foi inicialmente elaborada uma curva padrão de D-glucose solubilizada em etanol a 80% (v/v) na gama de concentrações de 0 a 0,625 mg/ml.

Para a quantificação do amido utilizou-se o *pellet* do procedimento anterior de e a este foram adicionados 5 ml de ácido perclórico a 30% (v/v) procedendo-se de seguida à incubação da mistura a 60 °C, durante 1 h. Seguiu-se uma centrifugação a 4800 g durante 20 min e a 4 °C, da qual se reservou 150 µl de sobrenadante, ao qual se adicionou 1,5 ml da solução de antrona procedendo-se à incubação a 100 °C durante 10 min. desta mistura. Após o arrefecimento em gelo da amostra esta foi submetida à leitura da absorvância a 625nm num espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384, sendo a solução controlo composta por 150 µl de ácido perclórico a 30% (v/v) e 1,5 ml de antrona. Na determinação do conteúdo em amido também se usou uma curva padrão de D-glucose, sendo esta solubilizada em ácido perclórico a 30% (v/v) e na gama de concentrações de 0 a 125 µg/ml.

2.3.6. Quantificação de prolina

A quantificação de prolina foi baseada no método de Khedr *et al.* (2003). Neste ensaio 100 mg de tecido foi macerado em azoto líquido e homogeneizado em 1,5 ml de ácido sulfosalicílico a 3%. O homogeneizado foi transferido para um tubo *ependorf* e centrifugado durante 10 min. a 10000 g e 4 °C. O sobrenadante (150 µl) foi transferido para um tubo *falcon* a que foi também adicionado 2 ml de ácido acético glacial e 2 ml de ninidrina ácida. De seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C durante 1 h, passaram pelo arrefecimento em gelo e foi-lhes adicionado 1 ml de tolueno tendo sido estes colocados em repouso, e no escuro, durante cerca de 20 min. até a mistura apresentar duas fases distintas. A fase superior foi recolhida e lida a absorvância nos 520 nm, no espectrofotómetro Jenway 7305. O conteúdo em prolina foi quantificado utilizando uma curva padrão de prolina na gama de concentrações de 0 a 50 µg/ml de prolina.

2.3.7. Quantificação de malondialdeído

Para quantificar o conteúdo de malondialdeído (MDA) utilizou-se o protocolo de Hodges (1999). Foram preparadas duas soluções controlo: negativo [TCA (ácido tricoloroacético) 20% w/v + BHT (hidroxitolueno butilado) 0,01% w/v] e positivo [TCA 20% + BHT 0,01% + TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,65% w/v] no sentido de excluir possíveis fatores interferentes. O tecido foliar (50 mg) foi macerado em azoto líquido em 1,25 ml de etanol 80% (v/v), sendo a mistura transferida para um tubo *ependorf* de 2ml e agitada no vórtex durante cerca de 30 seg. De seguida realizou-se uma centrifugação de 10 min. a 4800 g e 4 °C. Do sobrenadante obtido, 500 µl foram transferidos e divididos por 2 *ependorfs* (250 µl de sobrenadante para cada) aos quais se adicionou 1ml da solução TCA 20% + 0,01% BHT + TBA 0,65% num caso e outro 1ml da solução TCA 20% + 0,01% BHT no outro. Para os controlos positivo e negativo o procedimento foi o mesmo, mas em vez de sobrenadante foi adicionado etanol 80% (v/v). As amostras foram depois colocadas em banho-maria a 95 °C por 30 min e imediatamente arrefecidas em gelo para serem centrifugados a 3000 g durante 10 min.

A absorvância foi lida a 600 nm, 532 nm e 440 nm, num espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384, na presença das amostras de controlo e deste modo foram quantificados os equivalentes a MDA através das seguintes fórmulas:

$$[(\text{Abs } 532_{+\text{TBA}}) - (\text{Abs } 600_{+\text{TBA}}) - (\text{Abs } 532_{-\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{-\text{TBA}})] = A$$

$$[(\text{Abs } 440_{+\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{+\text{TBA}}) \times 0.0571] = B$$

$$\text{MDA (nmol.ml}^{-1}\text{)} = (A - B/157\,000) \times 10^6$$

2.3.8. Análise estatística

A análise estatística das amostras foi feita através do programa GraphPad Prism 6 tendo-se realizado uma ANOVA de duas vias em 6 plantas por tratamento. Aos dados das análises morfológicas aplicou-se uma ANOVA de uma via comparando as médias dos parâmetros medidos entre as linhas em estudo. Para verificação da homogeneidade de amostra usou-se o teste de Bartlett e o de Brown-Forsythe ($p \leq 0,05$) sempre que o número de amostras foi inferior a 5.

3. Resultados

3.1. Multiplicação das linhas de tamarilho *in vitro* e indução de embriogénese somática

O número de rebentos obtidos para as diferentes linhas de tamarilho estabelecidas *in vitro* foi registado com o intuito de verificar a capacidade de multiplicação dos clones em manutenção. A linha TvA, estabelecida a partir de uma árvore adulta, foi a que permitiu obter um maior número de rebentos comparativamente às restantes (200%) (Tabela 2; Fig. 5a). Das linhas estabelecidas a partir de sementes do fruto híbrido (THJB), foram as linhas THJB2 e THJB3 as que demonstraram maior potencial de multiplicação *in vitro* (Tabela 2).

Explantes foliares das linhas TvA e THJB foram submetidos a condições de indução de embriogénese somática, sem sucesso relativamente à formação de calo embriogénico ou embriões somáticos. Para todas as linhas, apenas se verificou a formação de calo friável, aparentemente sem capacidade embriogénica (Tabela 2; Fig. 5 b).

Tabela 2- Capacidade de multiplicação e indução de embriogénese somática das linhas de tamarilho estabelecidas *in vitro*.

Multiplicação			Indução de embriogénese somática	
Linha	Nº de rebentos inicial	Nº de rebentos final / Taxa de multiplicação	Nº de explantes	Nº de explantes com formação de calo
TvM1	17	21 / 24%	—	—
TvM2	24	51 / 113%	—	—
TvT	5	10 / 100%	—	—
TvA	23	69 / 200%	22	22
THJB1	6	10 / 67%	29	29
THJB2	12	24 / 100%	28	25
THJB3	5	18 / 260%	29	27
THJB4	6	17 / 55%	29	23
THJB5	5	7 / 40%	31	28

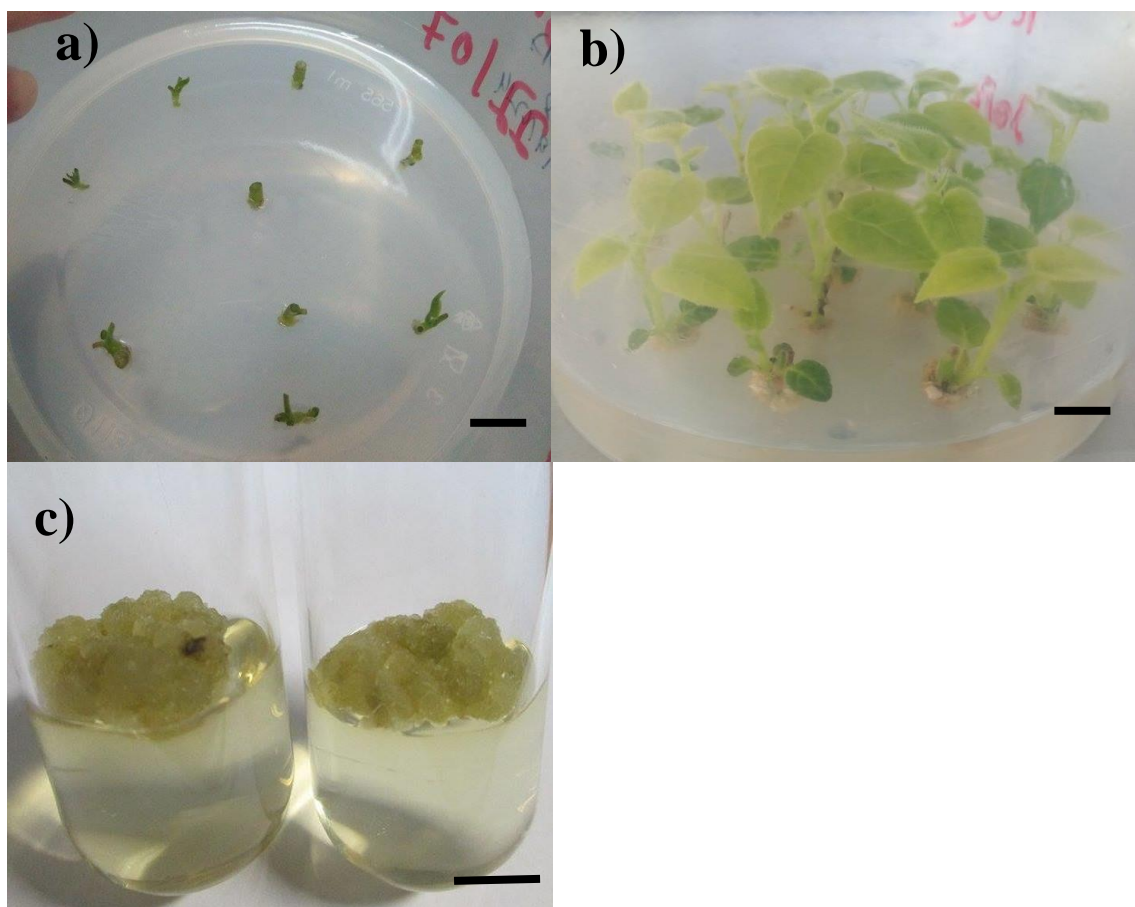


Figura 5- a) Explantes acabados de serem repicados. b) Explantes com 3 semanas de cultura. c) Calo resultante de indução de ES a partir de explantes foliares.

3.2. Proliferação de calo embriogénico, maturação e germinação de embriões somáticos

Para as linhas de calo embriogénico em manutenção (CE_TvA, CE_TvM1-2009 e CE_TvM2-2014), averiguou-se a o sucesso na maturação de embriões somáticos a partir do registo do número de massas de calo que apresentaram formação de embriões quando transferidas para meio TM (Fig. 6), bem como o sucesso na germinação dos embriões somáticos obtidos. A linha de calo embriogénico mais recentemente estabelecida (CE_TvM2-2014) foi a única que apresentou formação de embriões na totalidade de explantes (Tabela 3).

Relativamente ao desenvolvimento destes embriões em plantas, apenas a linha CE_TvM2-2014 apresenta uma percentagem de sucesso de 19% de sucesso (4 plantas), não se tendo verificado desenvolvimento de embriões nas restantes linhas.

Tabela 3- Número de explantes com sucesso no desenvolvimento de embriões somáticos e plantas.

Linha	Nº de explantes inicial	Nº de explantes com formação de embriões	Nº de explantes com embriões germinados
CE_TvM2-2009	72	34	0
CE_TvA	75	8	0
CE_TvM2-2014	20	21	4

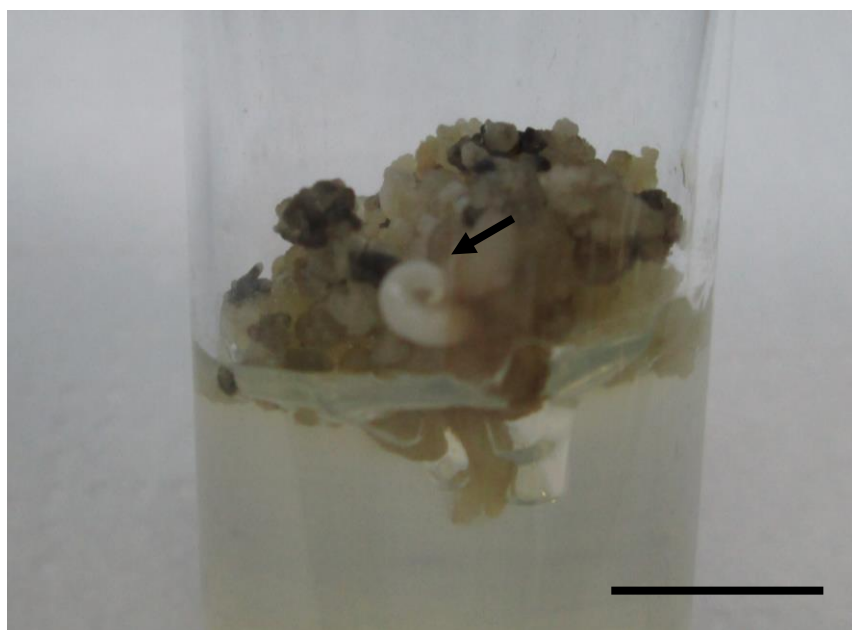


Figura 6 - Calo com formação de embriões. A seta evidencia um embrião. A barra corresponde a 1 cm.

3.3. Germinação *in vitro* e aclimatização das plântulas

Nos ensaios de germinação das novas linhas foi registrado o número de sementes que germinaram *in vitro* e o número de plantas que com sucesso foram aclimatizadas (Fig. 7) (Tabela 4). As percentagens de germinação nas sementes inoculadas em tubos foram superiores a 90% em todas as linhas exceto na TvS2 (70%). Não se verificaram quaisquer contaminações.

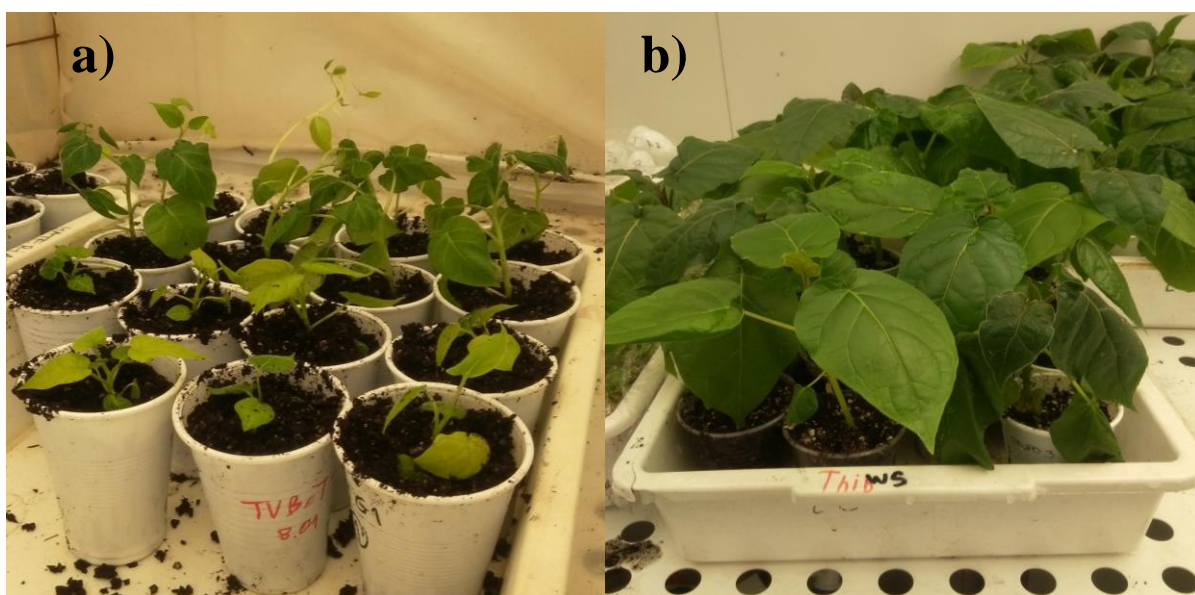


Figura 7 - a) Plantas após 2 semanas de aclimatização. b) Plantas após 4 semanas de aclimatização.

Na aclimatização destacou-se a linha TaJB em que todas as plantas provenientes de uma germinação bem sucedida foram aclimatizadas com sucesso. As linhas TvS1 e TvS4 apresentaram menor sucesso na aclimatização das plântulas, comparativamente às restantes.

As médias da biomassa, do rácio do comprimento parte aérea/raiz e rácio comprimento/largura da folha foram registadas no final da aclimatização e comparadas entre si para as diferentes linhas estabelecidas (Fig. 8). Relativamente ao parâmetro de biomassa total (Fig. 8a) e rácio do comprimento da parte aérea/raiz (Fig. 8b) não foram detetadas diferenças significativas entre as linhas, apesar de se observar maiores valores de biomassa para as linhas TaJB e TvS3. A linha TaJB, de tamarilho amarelo, foi aquela

que apresentou também valores de rácio comprimento da parte aérea/raiz superiores. De todas as linhas testadas, a TvS4, com origem em sementes de um fruto produzido na Colômbia, foi a que apresentou valores de biomassa total e rácio comprimento da parte aérea/raiz tendencialmente mais baixos, bem como valores do rácio do comprimento/largura das folhas significativamente mais baixos (Fig. 8c).

Tabela 4- Registo dos parâmetros de germinação e aclimatização.

Linha	Germinação		Aclimatização	
	Nº de explantes (sementes)	Nº de sementes germinadas	Plântulas colocadas a aclimatizar	Plantas com aclimatizadas com sucesso / % plantas aclimatizadas
TvJB	30	30	16	14 / 88%
TaJB	30	28	17	17 / 100%
TvS1	30	27	13	8 / 62%
TvS2	30	21	14	12 / 86%
TvS3	30	28	22	19 / 86%
TvS4	40	38	17	10 / 59%

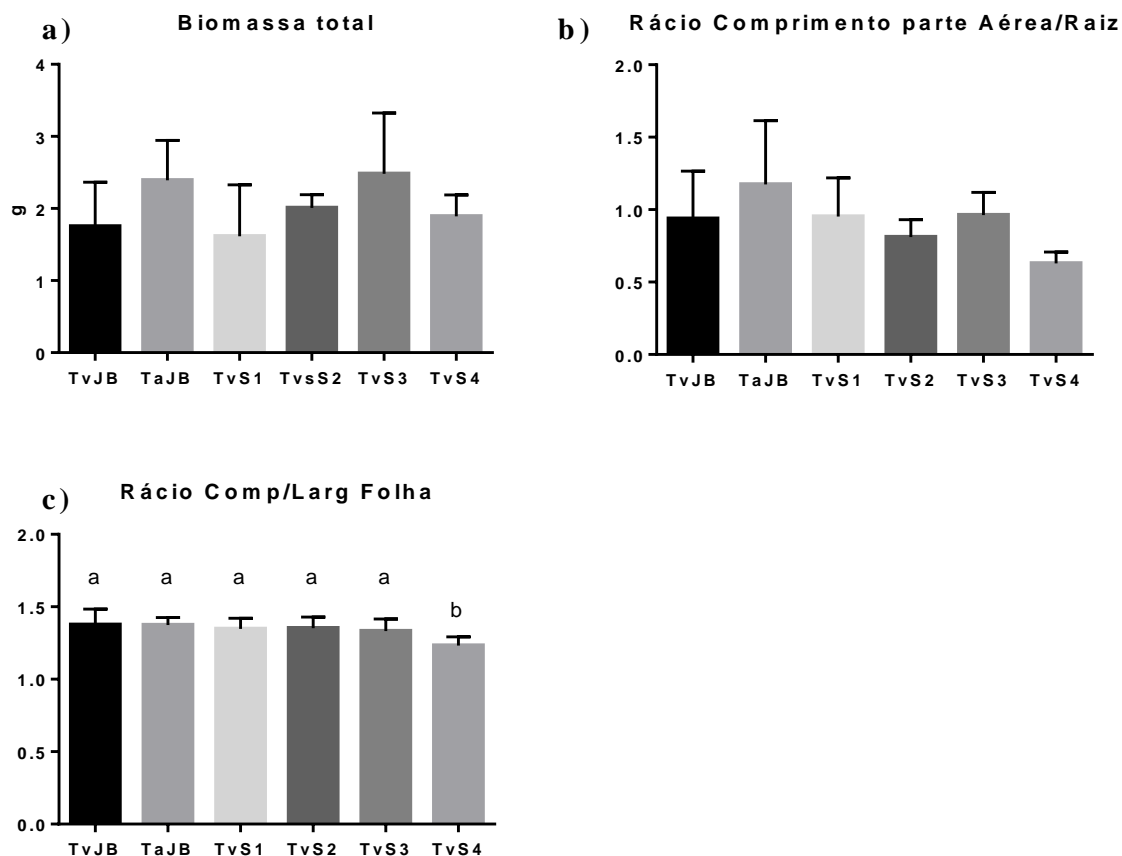


Figura 8- Parâmetros de desenvolvimento das plantas aclimatizadas. a) Biomassa; b) Rácio do comprimento da parte aérea/raiz; c) Rácio comprimento/largura das folhas.

3.4. Resposta fisiológica de plantas micropropagadas sobre stresse hídrico

A avaliação dos níveis de stresse hídrico de plantas aclimatizadas das linhas TvM2 (linha diploide, 2n) (Fig. 9a) e TvT (linha tetraploide, 4n) (Fig. 9b) foi realizada pela medição de diversos parâmetros cujos resultados passam a ser descritos nas secções seguintes.

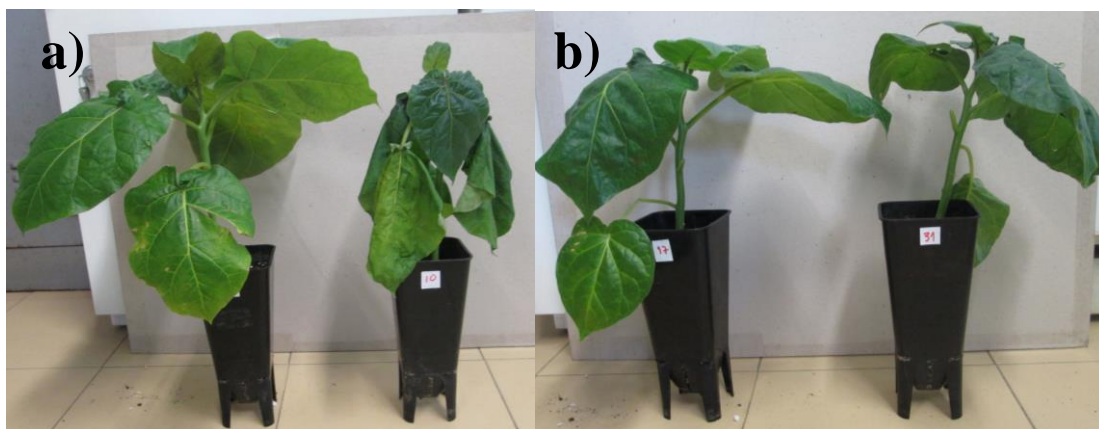


Figura 9 – Plantas representativas dos diferentes grupos em estudo no ensaio de stresse hídrico. a) Plantas diplóides (esq. com rega, dir. em stresse). b) Plantas tetraplóides (esq. com rega, dir. em stresse).

3.4.1. Parâmetros de crescimento e estado hídrico

Para os parâmetros de crescimento das plantas usadas no ensaio de stresse foram calculadas as médias da biomassa (Fig. 10a), do rácio do comprimento aérea/raiz (Fig. 10b), do comprimento da raiz (Fig. 10c) e do comprimento da parte aérea (Fig. 10d). Não se encontram diferenças significativas no que diz respeito à maioria destes parâmetros, sendo que apenas as médias registadas para o comprimento da parte aérea se observaram significativamente diferentes, com as plantas diplóides mais altas que as tetraplóides, particularmente no grupo com rega (Fig. 10d). De registar também o facto de as plantas tetraplóides apresentarem uma tendência de menor biomassa para as plantas do grupo em stresse comparativamente às plantas do grupo com rega, o que não se verifica para as plantas diplóides (Fig. 10a). O teor relativo de água (TRA) e o potencial hídrico também foram analisados. Para ambos os parâmetros o grupo de plantas diplóides em stresse (DS) distingue-se significativamente do grupo com rega (DR), apresentando valores mais baixos de teor relativo em água (Fig. 10e) e mais negativos de potencial hídrico (Fig. 10f). Diferenças essas também significativas quando comparadas com as plantas tetraplóides submetidas ao mesmo tratamento, particularmente no que diz respeito ao potencial hídrico (Fig. 10f).

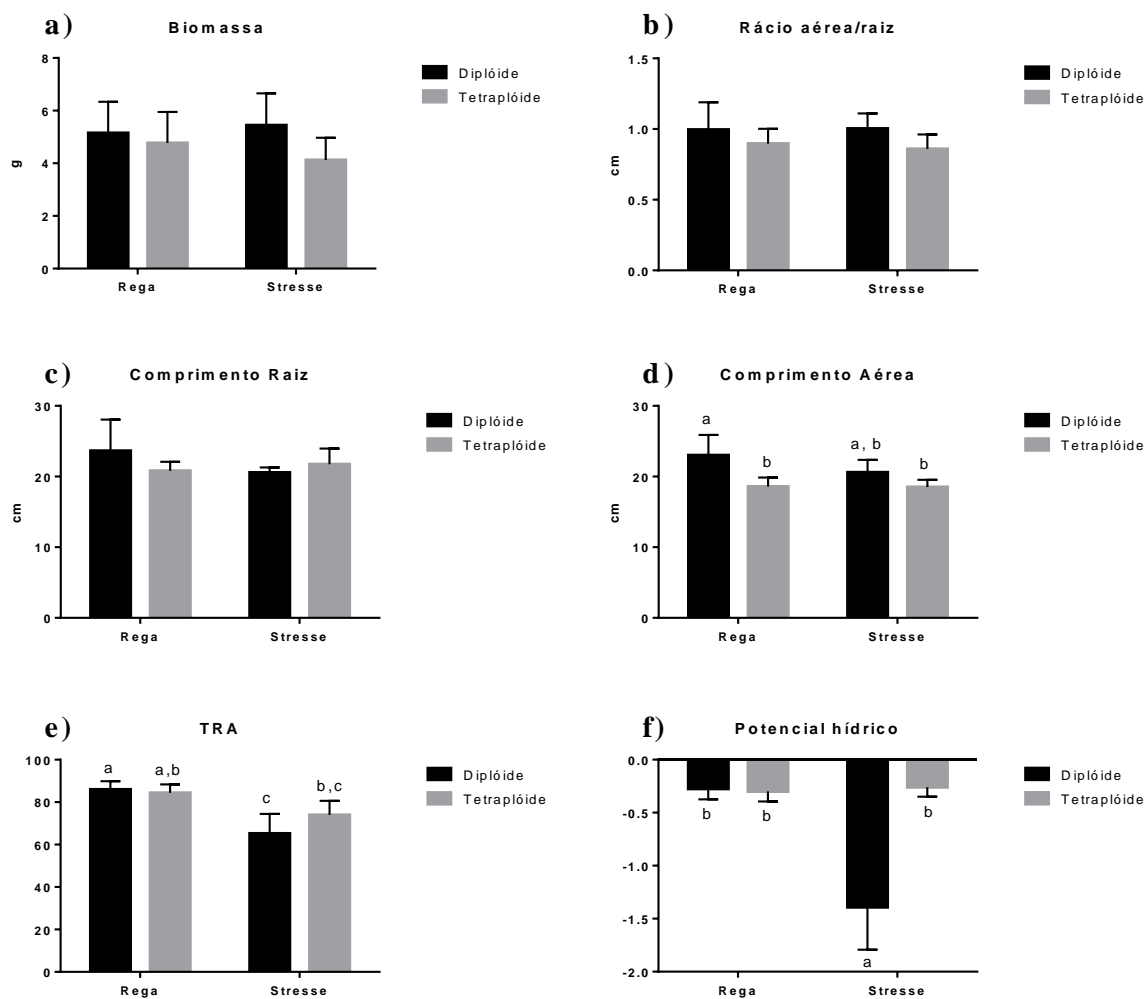


Figura 10 – Parâmetros de crescimento e estado hídrico de plantas 2n e 4n sujeitas a stresse hídrico e em plantas controlo. a) Biomassa das plantas tetraplóides e diplóides em condições de rega e stresse. b) Rácio do comprimento parte aérea/raiz. c) Comprimento da raiz. d) Comprimento parte aérea. e) Teor relativo em água (TRA). f) Potencial hídrico.

3.4.2. Pigmentos fotossintéticos

Na análise dos pigmentos fotossintéticos não se verificaram diferenças significativas nos níveis de pigmentos entre as plantas de diferentes ploidias nem nas plantas em diferentes tratamentos. O pigmento mais abundante é a clorofila a seguindo-se os carotenoides e o pigmento com menor presença é a clorofila b (Fig. 11).

Observou-se uma tendência de diminuição dos níveis de todos os pigmentos para as plantas tetraplóides em stresse (TS) quando comparadas com o grupo de plantas tetraplóides com rega (TR).

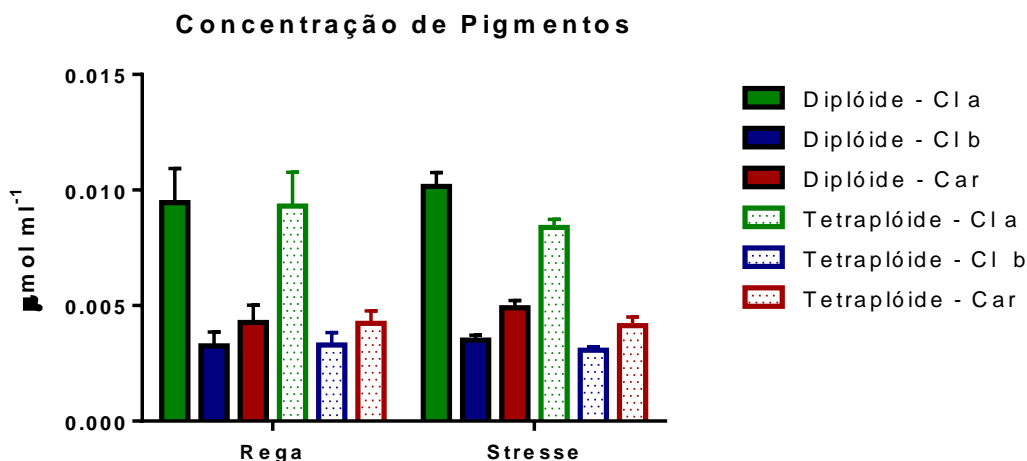


Figura 11- Concentrações dos pigmentos clorofila a (Verde), clorofila b (azul) e carotenoides (vermelho) nas plantas diplóides (preenchimento cheio) e plantas tetraplóides (preenchimento pontuado), nos tratamentos de rega e stresse.

3.4.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Relativamente aos parâmetros relativos às trocas gasosas efetuadas pelas plantas foram analisadas as médias de assimilação de CO₂ (A), a taxa de transpiração (E), a *intrinsic water use efficiency* (WUEi), a condutância estomática (gs) e o conteúdo intracelular de CO₂ (ci).

Para o parâmetro A (Fig. 12a) observou-se uma diferença significativa na assimilação de CO₂ entre plantas em stresse (menor assimilação) e plantas com rega. Também se observou que as plantas tetraplóides se distinguiram significativamente das diplóides no grupo com rega, apresentando um valor superior de assimilação de CO₂.

No parâmetro E (Fig. 12b) os resultados foram correlacionáveis com o observado para A. As taxas de transpiração foram significativamente superiores em plantas dos grupos com rega, havendo no entanto dentro destes diferenças significativas entre plantas diplóides e tetraplóides, estas últimas apresentaram maiores taxas de transpiração.

Sendo WUE_i (Fig. 12c) o rácio dos dois parâmetros previamente descritos, os resultados do mesmo foram de encontro ao já descrito. Verificaram-se diferenças significativas entre o grupo em rega e em stresse, tendo as plantas do grupo com rega apresentado maior WUE_i do que as do grupo de stresse. Ainda que as diferenças não sejam significativas, no grupo de stresse, entre as plantas diplóides e tetraplóides, observa-se uma tendência que atribui maior eficiência no uso da água a estas últimas.

Relativamente à g_s (Fig. 12d) constatou-se uma diferença significativa entre os grupos com rega e os expostos a stresse. A condutância estomática foi superior no grupo exposto ao tratamento de rega. Ainda que não se tenham verificado diferenças significativas entre as plantas do grupo com rega, observou-se a tendência para as plantas tetraplóides apresentarem uma maior condutância estomática.

Nos resultados referentes à ci (Fig. 12e), também se verificou diferenças significativas entre os grupos de rega e em stresse. Este último apresentou um maior conteúdo de CO_2 intracelular.

Na avaliação da fluorescência da clorofila a (Fig. 12f), verificou-se uma diferença significativa entre os grupos com rega e em stresse. Os grupos com rega apresentaram maior valor de fluorescência e embora não significativa existe uma diferença que atribui maior valor de fluorescência às plantas tetraplóides do mesmo.

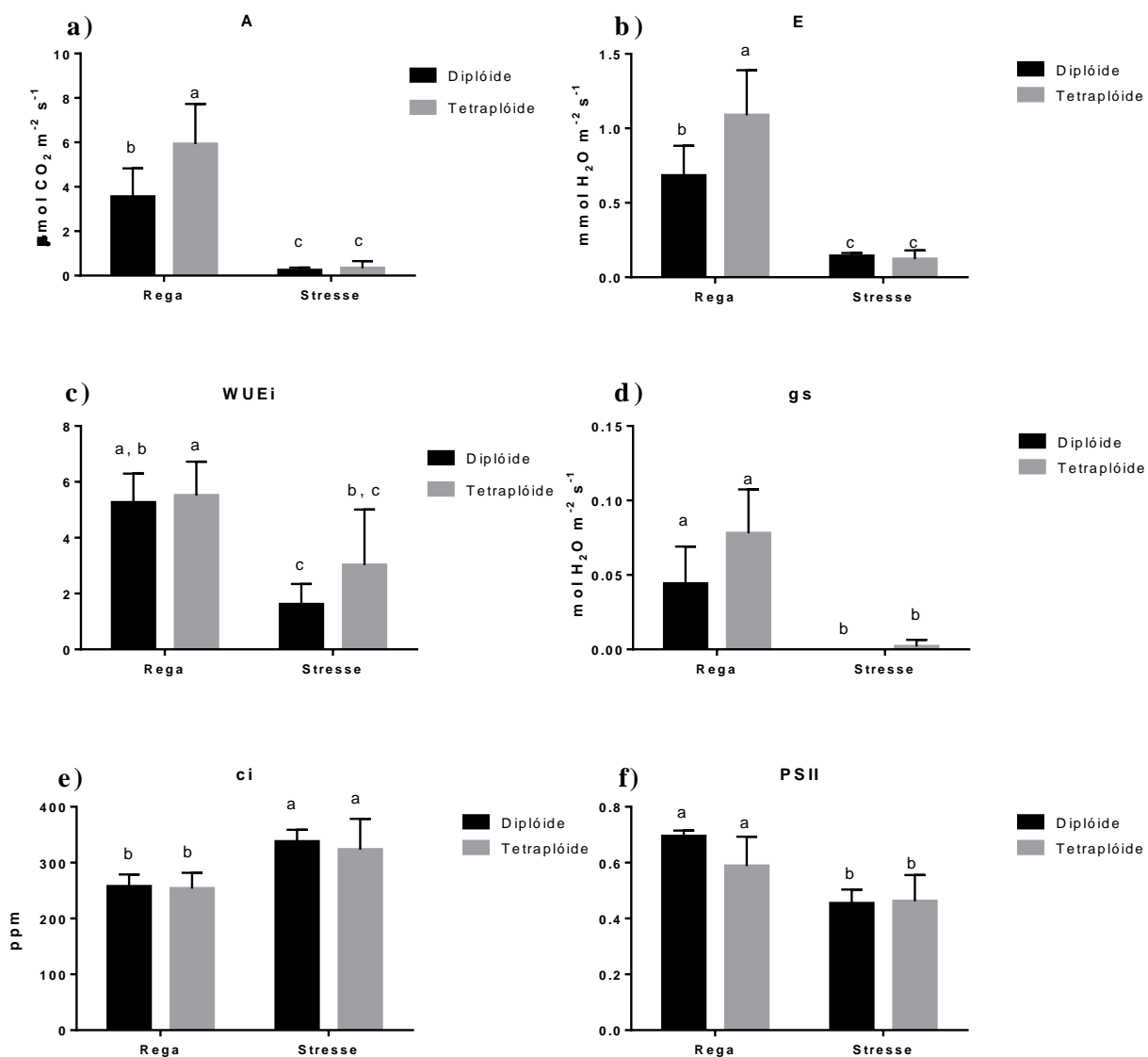


Figura 12 – Parâmetros fotossintéticos registrados em plantas 2n e 4n sujeitas a stresse hídrico e em plantas controle. a) Assimilação de CO_2 (A). b) Taxa de transpiração (E). c) *Intrinsic water use efficiency* (WUEi). d) Condutância estomática (gs). e) Conteúdo de CO_2 intracelular (ci). f) Fluorescência da clorofila a (PSII).

3.4.4. Quantificação de açúcares solúveis, amido, prolina e MDA

Nos resultados referentes às quantificações de açúcares solúveis, amido, prolina e MDA, apenas se verificaram diferenças significativamente distintas nos valores de prolina (Fig. 13c). Na quantificação de açúcares solúveis verificou-se uma tendência para que as plantas tetraplóides contenham menor quantidade de açúcares solúveis nos dois tratamentos (TS e TR). Observou-se também um ligeiro aumento no conteúdo em açúcares solúveis nas plantas tetraplóides em stresse, quando comparadas com as tetraplóides com rega (Fig. 13a). Já a quantidade de amido foi muito semelhante em tetraplóides e diplóides com rega. Verificou-se um aumento considerável, ainda que não significativo, nos níveis de amido das plantas em rega para as plantas em stresse. No grupo de stresse também se observou que as plantas tetraplóides apresentaram valores mais altos de amido em relação às diplóides (Fig. 13b).

As plantas diplóides em stresse (DS) foram as que apresentaram maior quantidade de prolina quando comparadas com todas as restantes dos grupos de stresse e rega. Verificou-se uma ligeira subida, ainda que não significativa, nos níveis de prolina dos tetraplóides com rega para os tetraplóides em stresse.

Apurou-se relativamente aos valores de MDA que estes são muito semelhantes entre as plantas com rega. Os valores aumentaram ligeiramente nos dois grupos de plantas (D e T) do tratamento com rega para as condições de stresse. No grupo de stresse verificou-se uma ligeira diferença entre as diplóides e tetraplóides, estas últimas apresentam um conteúdo em MDA ligeiramente superior (Fig. 13d).

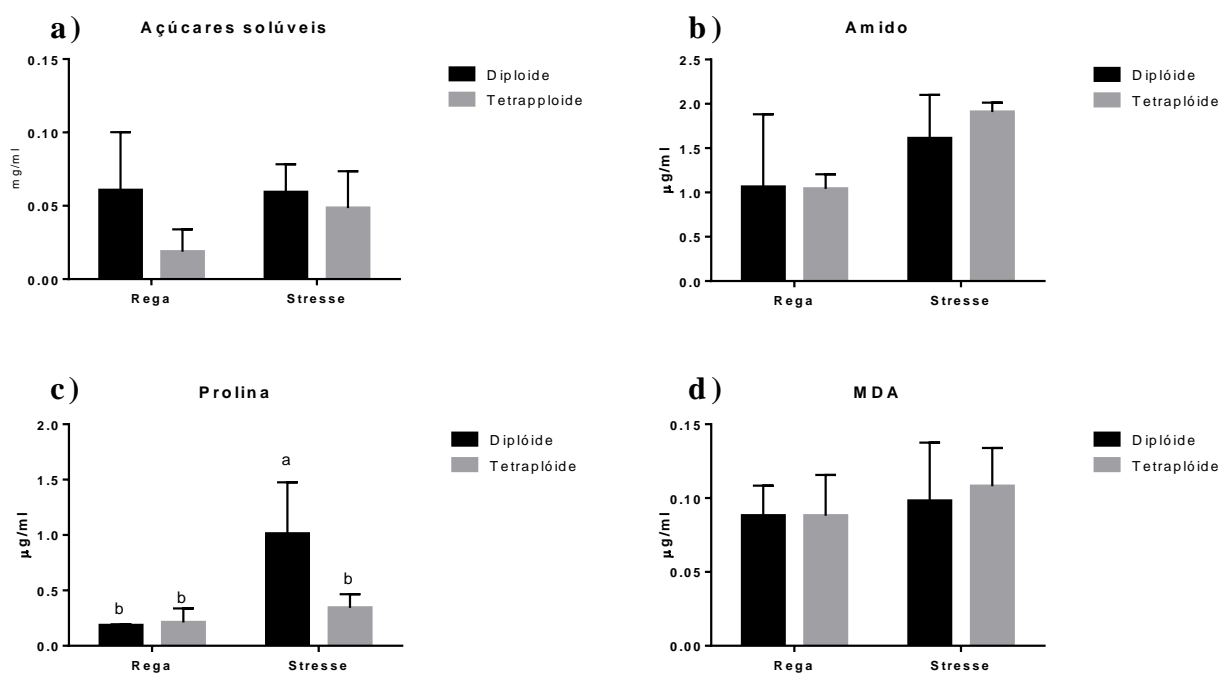


Figura 13 – Análise de alguns metabolitos em plantas 2n e 4n sujeitas a stresse hídrico e em plantas controlo. a) Açúcares solúveis. b) Amido. c) Quantificação de prolina. d) Quantificação de MDA

4. Discussão

4.1. Multiplicação de tamarilho *in vitro*

A micropropagação de plantas é um conjunto de técnicas que têm vindo a ser cada vez mais aplicadas com sucesso à clonagem de um vasto número de espécies através da aplicação da cultura de meristemas, organogénese ou embriogénese somática (Rathore *et al.*, 2004; Read e Bavougian, 2013; Harshal e Gautam, 2014). No entanto, as plantas lenhosas são geralmente consideradas mais difíceis de propagar através destas técnicas (Rathore *et al.*, 2004). Para além disso, a cultura de tecidos de plantas lenhosas apresenta alguns problemas relacionados com as particularidades do seu desenvolvimento, o que é particularmente relevante quando se pretende estabelecer *in vitro* clones selecionados pelas suas características de interesse e que já não se encontram na fase juvenil do desenvolvimento (Bonga e von Aderkas, 2000). Uma outra dificuldade associada às lenhosas é o facto de os explantes apropriados para cultura *in vitro* por vezes estarem apenas disponíveis em determinadas alturas do ano, a não ser que os clones selecionados sejam propagados em estufa, normalmente através de técnicas de macropropagação como a estacaria ou enxertia (Acquaah, 2012). Como forma de ultrapassar estas dificuldades, opta-se frequentemente pelo estabelecimento a partir de sementes com origem na planta de interesse para futura aplicação das técnicas de propagação aos genótipos que se revelam de interesse (Canhoto, 2010).

Com vista ao estabelecimento de um conjunto de genótipos de interesse de tamarilho, neste trabalho seguiram-se diferentes abordagens, que passaram pelo estabelecimento de linhas provenientes de hibridações e pela avaliação da capacidade de micropropagação de genótipos previamente estabelecidos. Os resultados obtidos demonstram uma maior taxa de multiplicação das plantas das linhas TvA e THJB3 (200% e 260%, respetivamente) face às restantes linhas. Vários autores têm referido que o genótipo dos explantes é um dos fatores que mais condiciona a capacidade de propagação *in vitro* (Correia e Canhoto, 2012). No tamarilho esta situação foi confirmada neste ensaio, mas também em trabalhos prévios em que se verificou uma

variação nas taxas de proliferação de meristemas em função do genótipo utilizado (Correia *et al.*, 2011).

No ensaio de germinação de sementes de várias proveniências constatou-se que o procedimento usado foi adequado, tendo-se obtido altas taxas de germinação (superiores a 70%) em todas as linhas. Na análise morfológica das plântulas obtidas observou-se apenas alguma variação na linha TvM4 (com origem na Colômbia) que se diferenciou das restantes pela menor dimensão da sua parte aérea. Estes resultados não são surpreendentes uma vez que é conhecido que o tamarilho é uma espécie que apresenta autofecundação (Morton, 1987; Lewis e Considine, 1999) reduzindo assim a variabilidade genética, mesmo em plantas obtidas por sementes. No entanto, esta avaliação foi realizada num estado ainda precoce, sendo natural que surjam diferenças em fases mais adiantadas do desenvolvimento, nomeadamente na altura da frutificação e, mais concretamente nas plantas obtidas a partir de sementes resultantes de hibridações.

4.2. Proliferação de calo embriogénico, maturação e germinação, e indução de embriogénese somática.

A clonagem de árvores de interesse através de embriogénese somática possui um enorme potencial não apenas na clonagem em larga escala, mas também em estudos de biologia fundamental, pois o desenvolvimento do embrião zigótico é difícil de seguir no interior do óvulo e do ovário (Correia e Canhoto, 2012). Além disso, a embriogénese somática é uma metodologia eficaz para a regeneração de plantas a partir de células geneticamente modificadas, como foi observado no tamarilho (Correia, 2011). Um dos problemas associados a esta técnica, no caso das plantas lenhosas, é a dificuldade em clonar plantas selecionadas (von Arnold, 2008; Bonga *et al.*, 2010). Uma forma de ultrapassar esta dificuldade pode passar pelo estabelecimento de árvores adultas através da proliferação de meristemas e ulterior utilização de explantes (e.g., foliares) de rebentos ou plântulas para indução de embriogénese somática (Correia *et al.*, 2011; Martins, 2012). A explicação para a reduzida expressão da totipotência em explantes de árvores adultas permanece em grande parte por clarificar havendo, no entanto, autores

que sugerem que esta reduzida capacidade embriogénica ou organogénica se possa dever a mecanismos epigenéticos que resultam na inibição do potencial regenerativo de células mais diferenciadas (Litz e Gray, 1995; von Arnold, 2008).

Das linhas de calo embriogénico em proliferação (CE_TvA, CE_TvM2-2009 e CE_TvM2-2014) apenas a linha estabelecida mais recentemente (CE_TvM2-2014) permitiu o desenvolvimento e subsequente germinação de embriões somáticos (19%; de 21 explantes com formação de embriões, 4 germinaram), destacando-se da linha homóloga estabelecida em 2009 (CE_TvM2-2009) e da linha com origem em material de árvore adulta (CE_TvA). A perda do potencial embriogénico do calo com origem mais antiga pode estar relacionada com alterações cromossómicas nas células resultantes de uma exposição prolongada às auxinas (Currais *et al.*, 2013), podendo esta ser a explicação para a não obtenção de embriões nas linhas de calo em proliferação há mais tempo (CE_TvA e CE_TvM2-2009)

No tamarilho, um dos maiores problemas na indução de embriogénese somática é uma ineficaz transição do calo proembriogénico para embrião e o seu desenvolvimento, muitas vezes em concomitância com formação de embriões anormais e germinação precoce. Este problema pode dever-se a uma inadequada maturação do embrião que é uma fase de elevada importância nas embriogénese somática e zigótica (Correia *et al.*, 2012).

Neste trabalho, para além da ES obtida a partir das linhas calo previamente estabelecidas, acima descrita, 169 explantes foliares jovens de linhas de tamarilho em propagação foram induzidos a sofrer embriogénese somática. Deste ensaio apenas se obteve a desdiferenciação do material vegetal em calo, não se tendo verificado formação de embriões. Ajustes no procedimento, assim como em variáveis na composição do meio podem ser uma forma de descobrir fatores que otimizem este processo.

4.3. Avaliação da resposta fisiológica de plantas micropropagadas sobre stresse hídrico

O stresse hídrico, como já referido, causa inúmeras alterações nas plantas, tanto a nível fisiológico como bioquímico e molecular dependendo da sua intensidade. Existe uma fase de aclimatização ao stresse e, eventualmente, com o agravar da intensidade do mesmo danos funcionais que podem conduzir a alterações irreversíveis nos organelos (Chaves *et al.*, 2003; Bedon *et al.*, 2011). Uma das respostas típicas ao stresse hídrico é a paragem do crescimento foliar e o fecho estomático, sendo este último apontado como uma das primeiras respostas. Como consequência destas respostas iniciais, as taxas de transpiração (E) e fotossíntese sofrem reduções consideráveis (Bedon *et al.*, 2011) o que, por sua vez, se reflete na assimilação do carbono (A) e na produtividade (Costa e Silva *et al.*, 2004; Bedon *et al.*, 2011).

Uma característica dos poliploides é a sua maior dimensão, quer em termos gerais quer ao nível dos diferentes órgãos, como por exemplo flores, frutos, raízes ou sementes. Esta situação resulta do aumento do volume celular das células tetraplóides. As folhas são geralmente mais largas, com uma espessura superior, e caracterizadas por um aumento na sua massa por unidade de área. (Acquaah, 2007; Song *et al.*, 2012). Possuem também um aumento no tamanho dos estomas e no número de cloroplastos por célula guarda (Dhawan e Lavania, 1996; Acquaah, 2007). Huang *et al.* (2007), observaram no trigo que à medida que a ploidia aumentava (de diplóide a tetraplóide ou hexaplóide), a quantidade de água usada na transpiração diminuía assim como o período de crescimento e que a WUE e a eficiência de uso de nutrientes aumentaram. Neste trabalho procurou-se comparar tamarilhos diplóides e tetraplóides em condições normais e de stresse de modo a tentar observar algumas diferenças no seu comportamento.

Assim, verificou-se que as plantas de tamarilho sujeitas a condições de stresse hídrico apresentavam taxas de transpiração e de assimilação de CO₂ reduzidas. Ainda que sem diferenças estatisticamente significativas, observou-se a tendência de as plantas tetraplóides apresentarem taxas mais elevadas de ambos os fatores referidos quando comparadas com as diplóides, refletindo-se estes valores no WUE_i obtido, um parâmetro que mede a eficiência do uso da água.

A condutância estomática (gs) e o conteúdo de CO₂ intracelular também foram medidos. No caso da gs verificou-se uma descida abrupta das plantas em rega para as do tratamento de stresse, tendo-se verificado um valor nulo de gs nas diplóides (DS) e um valor muito reduzido nas tetraplóides (TS). É conhecido que o stresse hídrico é um fator que afeta significativamente a condutância estomática (Souza *et al.*, 2004) e esta parece estar intimamente ligada com os fatores de transpiração e assimilação de CO₂ que, face ao impacto do stresse, apresentaram resultados semelhantes de decréscimo. O comportamento do tamarilho foi de encontro ao já observado em *Eucalyptus globulus* por Correia *et al.* (2014) e em *Melia azedarach* por Dias *et al.* (2013).

Algumas observações mostram que o stresse hídrico afeta negativamente o conteúdo intracelular de CO₂ (Dias *et al.*, 2014; Dias e Brüggemann, 2010) devido ao fecho estomático, que para além de proteger as plantas de perda de água, também limita a presença de CO₂ no espaço intracelular das células do mesófilo. Os resultados obtidos com tamarilho não corroboram estas observações, pois verificou-se que o ci aumentou nas plantas em stresse comparativamente às plantas regadas, quer nas diplóides quer nas tetraplóides. Esta diferença poderá estar relacionada com uma tendência geral das plantas em stresse (diplóides e tetraplóides) apresentarem valores indicativos de uma baixa taxa fotossintética e consequentemente uma maior acumulação de CO₂ intracelular.

A quantificação dos pigmentos clorofila a, clorofila b e carotenoides, e a comparação das plantas diplóides com as tetraplóides em condições de rega e de stresse não apresentou diferenças significativas. Observou-se apenas uma ligeira diminuição no conteúdo de pigmentos nas tetraplóides quando sujeitas a condições de stresse, enquanto que nas diplóides a quantidade de pigmentos aumentou. A diminuição da quantidade de pigmentos nos tetraplóides pode explicar as menores taxas de fotossíntese observadas (Correia *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2014).

A análise da fluorescência mostrou uma descida significativa na fluorescência tanto nas plantas diplóides como nas tetraplóides quando sujeitas a stresse hídrico, tendo a descida sido ligeiramente mais acentuada nas plantas diplóides. A redução do PSII pode estar em grande parte relacionada com uma diminuição da proporção de centros de reação do fotossistema II em estado “aberto” devido ao consumo limitado de NADPH ou à reduzida eficiência na captura da energia de excitação por parte dos centros de

reação do PSII (Correia *et al.*, 2006), considerando que os valores de clorofila a não desceram significativamente. Em concordância com outros resultados obtidos, estes valores confirmam que o stresse hídrico afeta a capacidade fotossintética, levando as plantas a reduzirem a taxa de fotossíntese como resposta à baixa disponibilidade de água. (Chaves *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2014)

Relativamente à quantificação da biomassa, não se verificaram diferenças significativas entre as plantas de diferentes ploidias, nem entre os tratamentos. No entanto, verificou-se uma ligeira diminuição de biomassa dos TR para TS, não observável nos diplóides. Este resultado poderá refletir uma melhor adaptação dos tetraplóides à situação de stresse, com uma adaptação mais rápida através da redução das taxas fotossintéticas e consequente diminuição da produção de biomassa, comparativamente aos diplóides.

Na avaliação dos parâmetros do estado hídrico das plantas testadas verificou-se o seu teor relativo em água (TRA) e o potencial hídrico. Para o parâmetro TRA apenas se observaram diferenças significativas no comportamento das plantas diplóides em stresse, quando comparadas a todas as restantes. De facto o seu TRA desceu mais abruptamente das condições de rega para o stresse, do que o observado nas tetraplóides. No caso do potencial hídrico uma diferença significativa e expressiva indicou o menor potencial hídrico das plantas DS quando comparadas com todas as dos outros grupos em análise. Estes dados estão em concordância com o já observado noutros estudos (Correia *et al.*, 2014) Os dados obtidos com estes dois parâmetros permitem concluir que os efeitos da exposição a stresse hídrico foram mais severos nas plantas diplóides, comparativamente às tetraplóides, que apresentaram uma maior capacidade de resposta perante as mesmas condições.

Com o objetivo de caracterizar possíveis mecanismos responsáveis por uma melhor resposta das plantas tetraplóides comparativamente às diploides em termos de stresse hídrico, foram avaliados diversos parâmetros, nomeadamente os níveis de açúcares solúveis e de amido nas plantas em estudo. No que se refere à quantificação dos açúcares solúveis, observou-se um comportamento diferente nas plantas diplóides e nas tetraplóides. Nas diplóides apenas se verificou uma descida ligeira no conteúdo em açúcares solúveis da rega para o stresse, enquanto que nas tetraplóides esta discrepância de valores foi maior tendo o conteúdo em açúcar subido acentuadamente nas plantas sob stress. Este aumento dos açúcares nas TS pode indicar a acumulação destes compostos

como agentes osmorreguladores, bem como um reduzido consumo de solutos orgânicos como medida adaptativa ao stresse (Silva *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2012).

No que diz respeito aos níveis de amido, verificou-se um aumento do teor deste polissacarídeo dos grupos controlo para os grupos sujeitos a condições de stresse, tendo-se verificado um maior incremento para os tetraplóides. O facto de não se terem verificado descidas significativas no conteúdo de açúcares solúveis, e mais particularmente de amido, nas situações de stresse, poderá significar uma inibição da hidrólise do amido em açúcares simples em condições de stresse (Souza *et al.*, 2004).

A análise dos níveis de prolina forneceu resultados muito interessantes, com a ocorrência de uma subida estatisticamente significativa dos níveis de prolina nas plantas diploides quando submetidas a stresse hídrico. No caso das tetraplóides esta subida foi ligeira. A prolina tem um papel central na habilidade de reação das plantas ao stresse abiótico (Pavlik *et al.*, 2010) uma vez que é um aminoácido que atua como mediador no equilíbrio osmótico, protegendo as macromoléculas em períodos de desidratação e atuando também como um protetor do stresse oxidativo, um tipo de stresse frequentemente associado ao stresse hídrico (Li *et al.*, 2010). Assim, as plantas diplóides em stresse, que apresentam maior quantidade de prolina, parecem possuir uma maior fragilidade ao stresse hídrico quando comparadas com as tetraplóides.

Na quantificação de MDA, também se verificou uma subida ligeira (não significativa) de valores do grupo de rega para o de stresse, tendo esta subida sido mais acentuada nas plantas tetraplóides. Ensaio realizados por outros autores mostraram um aumento de MDA associado à peroxidação lipídica no arroz (Sharma e Dubey, 2007), na batata (Tabaldi *et al.*, 2009), entre outros, quando expostos a stresse de toxicidade com alumínio (Silva *et al.*, 2013). A presença de MDA aparentemente coexiste com a presença de vários antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, visto que no estudo de Silva *et al.* (2013), se verificou que plantas de sensíveis à presença de Al com o aumento de MDA também apresentaram aumento de algumas enzimas anti-oxidantes, e as plantas tolerantes a Al, em contraste, não apresentaram aumento em MDA, mas denotaram um aumento em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Observações semelhantes foram realizadas no milho (Giannakoula *et al.*, 2008). O stresse hídrico pode também despoletar estas reações, tal como observado no eucalipto por Correia *et al.* (2014). Estudos mais abrangentes no tamarilho ao nível da permeabilidade da membrana celular, e da atividade de enzimas antioxidantes e quantificação de

antioxidantes não-enzimáticos teriam interesse para perceber se este se comporta como outras espécies já analisadas.

5. Conclusões

A micropropagação *in vitro* de tamarilho associada ao estabelecimento de material adulto com interesse, e à posterior indução de embriogénese somática mostra-se um conjunto de técnicas com interesse a serem aprimoradas para que os procedimentos se tornem mais eficazes e menos dispendiosos. Neste trabalho, a indução de embriogénese somática não permitiu obter embriões nem plantas. De calo embriogénico já em manutenção, o calo mais recentemente estabelecido foi o único a originar embriões e plantas. Existem ainda muitas limitações associadas à aplicação da ES, como é o caso da recalcitrância do material adulto quando induzido, a proliferação contínua de calo e ainda a presença frequente de embriões anómalos.

Com o ensaio de germinação de sementes de vários frutos constatou-se que o procedimento usado foi adequado, tendo-se obtido altas taxas de germinação em todas as linhas. Nos ensaios de morfologia observou-se apenas discrepância na linha TvM4 (com origem na Colômbia) que se diferenciou das restantes pela menor dimensão da parte aérea.

A resposta fisiológica das plantas propagadas sob stresse hídrico mostra-nos que os exemplares tetraplóides de tamarilho reagem melhor ao stresse imposto. Nos parâmetros hídricos, TRA e potencial hídrico os tetraplóides apresentam valores mais baixos que os diplóides sendo este um fator positivo na interpretação do estado da planta.

Nos parâmetros de taxa de transpiração (E), assimilação de CO₂ (A) e condutância estomática (gs) verificou-se uma descida aquando da comparação da rega com stresse, tendo no entanto os tetraplóides apresentando valores mais altos que os diplóides. Consequentemente, a *intrinsic Water Use Efficiency* (WUEi) dos tetraplóides é superior ao dos diplóides.

O conteúdo de CO₂ intracelular (ci) aumenta do tratamento de rega para o de stresse. Na fluorescência do PSII existiu apenas uma ligeira descida da mesma do tratamento de rega para o de stresse.

Verifica-se uma subida dos açúcares solúveis nos tetraplóides da rega para o stresse, e uma descida nos diplóides, nas mesmas circunstâncias. No caso do amido as plantas tetraplóides em stresse apresentaram maior quantidade que as diplóides.

As quantificações de prolina apontam para que os exemplares mais afetados pelo stresse sejam os diplóides, pela quantidade superior de prolina quantificada nos mesmos, observando-se que no caso dos tetraplóides o aumento da quantidade de prolina, na comparação de rega para stresse foi mais reduzido.

Na quantificação de MDA as diferenças entre tetraplóides e diplóides não foram significativas. Seria interessante estudar o tamarilho nesta perspectiva, utilizando outros parâmetros correlacionáveis.

Parece pois poder concluir-se que as plantas tetraplóides, no estado de desenvolvimento em que foram testadas, apresentam um maior grau de tolerância ao stresse hídrico que os correspondentes diplóides. Embora estes resultados sejam prometedores importa ainda comprovar os dados obtidos em plantas em fase de produção, nomeadamente na quantidade e qualidade dos frutos produzidos.

6. Bibliografia

- Acquaah, G. (2007) Principles of plant genetics and breeding. Polyploidy in Plant Breeding. Wiley-Blackwell, Malden. 13: 214 -130.
- Acquaah, G. (2012). Principles of Plant Genetics and Breeding, 2^a ed. John Wiley & Sons, Ltd. E.U.A.
- Antunes, P. (2010). Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- Barghchi, M. (1986). *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report: 52. Department of Scientific and Industrial Research (DSIR). New Zealand.
- Barghchi, M. (1998). In vitro regeneration, plant improvement and virus elimination of tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt]. In: Davey, M. R., Alderson, P. G., Lowe, K. C., Power, J. B. (Eds). Tree Biotechnology – Towards the Millennium. Nottingham University Press. Nottingham: 173-185
- Bedon, F., J. M. (2011). Interaction between environmental factors affects the accumulation of root proteins in hydroponically grown *Eucalyptus globulus* (Labill.). Plant Physiology and Biochemistry 49: 69-76.
- Bonga, J. M. e von Aderkas, P. (2000). Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. Tree Physiol 20: 921–928
- Bonga, J. M., Klimaszewska, K., von Aderkas, P. (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tiss Org Cult. 100: 241-254.
- Brito, G., Costa, A., Fonseca, H. M. A., Santos, C., (2003). Response of *Olea europaea ssp maderensis in vitro* shoots exposed to osmotic stress. Sci. Hortic. 97 (3 e 4): 411 - 417.
- Brown, D. e Thorpe, T. (1995). Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11: 409 - 415.

- California Rare Fruit Growers. (2015). Plant / Tree Descriptions. Obtido de California Rare Fruit Growers: <http://www.crfg.org/descr/descr.html> (Acedido em Junho de 2015).
- Canhoto, J. M., Lopes, M. L., Cruz, G. S. (2005) Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: Jain, S. M., Gupta, P. K. (Eds.). Protocol for Somatic Emryogenesis in Woody plants. Springer. Dordrecht, pp. 379-389
- Canhoto, J. (2010). Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Durán-Vila, N., Navarro, L., Peña, L. (1998). Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research* 7: 51-59
- Charles, D. J. (1993). Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua*. In: J. Janick, J.E. Simon (eds). L. New Crops. Wiley, New York.
- Chaves, M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Functional plant biology* (30): 239-264
- Chawla, H. (2010). Introduction to Plant Biotechnology. 3ª Ed. Science Publishers. Inc Enfield, USA.
- Cohen, D. e Elliot, D. (1979). Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 29: 177-179
- Correia, M., Osório, M., Osório, J., Barrote, I., Martins, M., David, M., 2006. Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environ. Exp. Bot.* 58: 75-84
- Correia, B., Pintó-Marijuan, M., Neves, L., Brossac, R., Dias, M. C., Costa, A., Castro, B., Araújo, C., Santosa, C., Chaves M. M., Pinto, G. (2014). Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum* 150: 580–592

- Correia, S., Lopes, M. L., Canhoto, J. M. (2011). Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees* 25: 1009-1020
- Correia, S. e Canhoto, J. M. (2012). Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From *in vitro* cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae* 148: 161-168
- Correia, S., Cunha, A. E., Salgueiro L., Canhoto J., (2012). Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betaceae*): Approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109: 143-153
- Costa e Silva, F., Shvaleva, A., Maroco, J. P., Almeida, M. H., Chaves, M. M., Pereira J. S. (2004). Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. *Tree Physiol* 24: 1165–1172
- Dhawan, O. e Lavania, U. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica* 87: 81-89
- Dias, M. C. e Brüggemann, W., (2010). Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. *Photosynthetica* 48: 96-102
- Dias, M. C., Pinto, G., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J., Silva, S., Santos, C. (2013). Photosynthetic parameters of *Ulmus minor* plantlets affected by irradiance during acclimatization. *Biologia Plantarum* 57: 33-40
- Dias, M. C., Azevedo, C., Costa, M., Pinto, G., Santos, C. (2014). *Melia azedarach* plants show tolerance properties to water shortage treatment: An ecophysiological study. *Plant Physiology and Biochemistry* 75: 123-127
- Dore, M. (2005). Climate change and changes in global precipitation patterns: what do we know? *Environment International* 31: 1167 – 1181
- FAO. (2009). The State of Food Insecurity in the World 2015. Obtido de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/hunger/key-messages/en/> (Acedido em Junho de 2015).

- Harshal, A. B. e Gautman, S. P. (2014). Plant tissue culture: A review. World Journal of Pharmaceutical Sciences. Atom an Cell Publishers.
- Huang, M., Deng, X., Zhao, Y. Zhou, S., Inanaga, S., Yamada, S., Tanaka, K. (2007). Water and Nutrient Use Efficiency in Diploid, Tetraploid and Hexaploid Wheats. Journal of Integrative Plant Biology, 49: 706–715
- Gatita, I. C. e Almeida, J. (2003). Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. Forest Venez 47: 9-13
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I., Yupsanis, T. (2008). Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. J Plant Physiol 165: 385–96
- Guimarães, M. L., Cruz G. S., Montezuma-de-Carvalho, J. M. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Plant Cell Tiss Org Cult 15: 161-167
- Guimarães M., Tomé M., Cruz G. (1996). *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). In: Bajaj, Y. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees IV. Springer-Verlag, Berlin. pp. 120-137
- Hodges, J. M. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207: 604-611
- Khedr, A., Abbas, M., Wahid, A., Quick, W., Abogadallah, G. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Panocratium maritimum* L. to salt-stress. Journal of Experimental Botany 54: 2553-2562
- Kozloski, T. T. e Pallardy, S. G. (1997). Physiology of woody plants. Em: *Physiology of woody plants 3ª ed.*: Academic Press. San Diego. pp. 292.

- Lewis, D. H. e Considine, J. A. (1999). Pollination and fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) 1. Floral biology. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 27: 101-112
- Li, G., Wan, S., Zhou, J., Yang, Z., Qin, P. (2010). Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. Ind Crops Prod 31:13–19
- Litz, R. E., Gray, D. J. (1995). Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World J Microbiol Biotechnol 11: 416-425
- Lopes, M. L., Ferreira, M. R., Carloto J. M., Cruz, G. S., Canhoto, J. M. (2000). Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 6. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 433 -455
- Martins, J. (2012). Estudos de cultura *in vitro* em medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento. Universidade de Coimbra. Tese de Mestrado.
- Meadows, L. R. (2002). Growing tamarillo relatives. The New Zealand Home Garden. Em: www.naturalhub.com (Acedido em Julho de 2015).
- Mertz, C., Brat, P., Caris-Veyrat, C., Günata, Z. (2009). Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). Food Chemistry 119: 653–659
- Montoya, J., Escobar, R., Debouck, D. (2000). Development of a freezing methodology in liquid nitrogen of tree tomato (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) seeds: p. 5. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Morton, J. (1987). Tree Tomato. Fruits of Warm Climates. JF Morton (Ed.) Miami. pp. 437- 440
- Murashige, T. e Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

- Obando, M., Goreux, A., Jordan, M. (1992). Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. *Ciencia e Investigacion Agraria* 19: 125-130
- Obando, M. e Jordan, M. (2001). Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo) cultivated *in vitro*. *Acta Hort* 560: 429-432
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Staszková, L., Neuberg, M., Kaliszová, R., et al. (2010) The effect of arsenic contamination on aminoacids metabolism in *Spinacia oleracea* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1309–1313
- Pintos, B., Manzanera, J., Bueno, M. (2007). Antimitotic agents increase the production of double-haploid embryos from cork oak anther culture. *Journal of Plant Physiology* 164: 1595-160
- Prohens J. e Nuez F. (2001). The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review* 1: 43-68
- Rathore, J.S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M., Dagla, H. R. (2004). Micropropagation of Woody Plants. In: Srivastava, S., Narula, A., Srivastava, S. (Eds). *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Anamaya Publishers. New Delhi, India. pp. 195-205
- Read, P. E. e Bavougian, C. M. (2013). In Vitro Rejuvenation of Woody Species. Em: Maurizio Lambardi *et al.* (eds.). *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology* vol. 994: 383- 395
- Rodriguez, E., Santos, C., Azevedo, R., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Dias, M.C., (2012). Chromium (VI) induces toxicity at different photosynthetic levels in pea. *Plant Physiol. Biochem* 53: 94-100
- Santos, A. L., (2012). Estudos de organogénese em *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Tese de mestrado. Universidade do Porto.
- Sharma, P. e Dubey, R. S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep* 26: 27–38

- Shinozaki, K. Y. S. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327–334
- Silva, E., Ferreira-Silva, S., Viégas, R., Silveira, J., (2010). The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. *Environ. Exp. Bot.* 69: 279-285
- Sims, D. A. e Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Elsevier - Remote Sensing of Environment* 81: 337 – 354
- Song, C., Liu, S., Xiao, J., Zhou, Y., Qin, Q., Zhang, C., Liu, Y. (2012). Polyploid organisms. *Science China Life. Science* 55: 301-311
- Souza, R., Machado, E., Silva, J., Lagoa, A., Silveira, J. (2004). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* 51: 45–56
- Tabaldi, L. A., Cargnelutti, D., Goncalves, J. F., Pereira, L. B., Castro, G. Y., Maldaner, J., *et al.* (2009). Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere* 76 (10): 1402–1409
- Thorpe, T. A. e Stasolla, C. (2001). Somatic Embryogenesis. In: Bhojwani, S. S., Soh, W. Y. (Eds.). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 279-336
- Tomé, M. C., Guimarães, M. L., Cruz, G. S. (1992). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Abstr 1st Congresso Hispano-Luso de Biotecnologia. Santiago de Compostela, Spain.
- Varghese, J. M. e Bhat, A. I. (2011). An Efficient *Agrobacterium* - Mediated Transformation Protocol for Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Using Embriogenic Mass as Explant. *J Crop Sci Biotech* 14: 247 - 254
- Vidal, N., Mallón, R., Valladares, S., Meijomín, A. M., Vieitez, A. M. (2010). Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of juvenile and mature *Quercus robur*. *Plant Cell Rep* 29: 1411-1422

- von Arnold, S. (2008) Somatic embryogenesis. In: George, E. F., Hall M. A., de Klerk, D. (eds). Plant propagation by tissue culture, vol 1, 3^a ed. Springer, Dordrecht. pp. 335–354
- Yang, X. M., Cao, Z. Y., An, L. Z., Wang, Y. M., Fang, X. W. (2006). In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152: 217–224
- Zhang, J. e Davies, W. J. (1989). Absciscic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell and Environment* (12): 73-81
- Zhang, J., Zhang, M., Deng, X. (2007). Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tiss Org* 89: 211-216.
- Zhang, W., Hao, H., Ma, L., Zhao, C., & Yu, X. (2010). Tetraploid muskmelon alters morphological characteristics and improves fruit. *Scientia Horticulturae* 125: 396–400